

Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie der
Universität Marburg
Direktor: Prof. Dr. med. W. Schmid

Beeinflussung der durch Phenobarbital induzierten Lebervergrößerung durch Hemmstoffe von Transskription, Translation und DNS - Replikation

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin
des Fachbereiches Humanmedizin

der

Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Ingrid Reichwein, geb. Kuntzsch
aus Kassel

Marburg/Lahn 1974

Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie der
Universität Marburg
Direktor: Prof. Dr. med. W. Schmid

Beeinflussung der durch Phenobarbital induzierten Lebervergrößerung durch Hemmstoffe von Transskription, Translation und DNS-Replikation

Inaugural-Dissertation

zur

**Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin
des Fachbereiches Humanmedizin**

der

Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Ingrid Reichwein, geb. Kuntzsch

aus Kassel

Marburg/Lahn 1974

Fotodruck: Erich Mauersberger, Marburg



Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin der
Philipps-Universität Marburg am 10.5.1974

gedruckt mit Genehmigung des Fachbereiches

Dekan: Prof. Dr.med. H. Oepen

Referent: Prof. Dr.med. W. Kunz

Correferent: Prof. Dr.med. W. Schmid

Meinen Eltern

in Dankbarkeit gewidmet

INHALTSVERZEICHNIS

A. Einleitung

B. Methodischer Teil

- I. Tiermaterial und Tierhaltung
- II. Präparate und Applikationsweise
- III. Gewebsentnahme und Extraktaufbereitung
- IV. Bestimmung der Enzymaktivitäten
 - a) Testansätze
 - b) Berechnung der Enzymaktivitäten
 - c) Bestimmung und Berechnung von
Cytochrom P-450 und Cytochrom b 5
 - d) Bestimmung der Hexobarbital-Schlafzeit
- V. Statistische Auswertung

C. Experimenteller Teil

- I. Beeinflussung von Lebergröße und
Enzymgehalten der Leber durch Phenobarbital
- II. Beeinflussung der Phenobarbital-Wirkung
durch Hemmstoffe der Protein- und Nuclein-
säuresynthese
 - 1. Beeinflussung der Phenobarbitalwirkung
durch Hemmung der Transkription mit
Actinomycin
 - a) Beeinflussung der Induktion mikrosomaler
Enzyme durch Actinomycin
 - b) Beeinflussung der Induktion cytoplas-
matischer und mitochondrialer Enzyme
durch Actinomycin

2. Beeinflussung der Phenobarbitalwirkung
durch Hemmung der Translation

a) Wirkung von Actidion

α) Beeinflussung der Induktion mikrosomaler Enzyme durch Actidion

β) Beeinflussung der Induktion cytoplasmatischer und mitochondrialer Enzyme durch Actidion

b) Wirkung von Puromycin

c) Wirkung von Chloramphenicol

3. Beeinflussung der Phenobarbitalwirkung
durch Hemmung der DNS-Replikation durch
Mitomycin

D. Diskussion

E. Zusammenfassung

F. Anhangstabellen

G. Literaturverzeichnis

A. Einleitung

Bei chronischer Zufuhr zahlreicher Fremdstoffe tritt im Tierexperiment eine erhebliche Lebervergrößerung auf, die bis zur Verdoppelung des Organvolumens führen kann. (Zusammenfassende Literatur bei KUNZ et al., 1966). Trotz vieler Untersuchungen sind initiale Ursachen, kausale Mechanismen und biologische Bedeutung des Phänomens noch weitgehend ungeklärt. Eine fundierte toxikologische Bewertung des Phänomens mußte deshalb bislang weitgehend hypothetisch bleiben.

Neben der Annahme, daß es sich bei der Hypertrophie um ein normales und unbedenkliches Adaptationsphänomen handelt, das sogar die Möglichkeit einer therapeutischen Anwendung enthält, wird von anderen Autoren die Ansicht vertreten, daß hier eine hepatotoxische Wirkung vorliegt (GOLDBERG et al., 1964).

Die Entscheidung dieser Fragen setzt eine genauere Kenntnis der Wirkungsmechanismen voraus.

Im wesentlichen sind drei Prinzipien zu diskutieren.

1. Von einem großen Teil der Untersucher (REMMER, H. et al., 1963) wird angenommen, daß es sich um eine gesteigerte Synthese von Zellbestandteilen handelt. Der Organvergrößerung würde also eine echte Induktion zugrunde liegen, die mit der Wirkung wachstums-induzierender Hormone verglichen werden kann (BRODIE, B.B. et al., 1962). Es könnte sich dabei um eine durch Pharmaka bedingte primäre Induktion der spezifischen Metabolisierungsenzyme handeln, deren Synthese eine Induktionskette weiterer Enzyme des zellulären Syntheseparameters nach sich zieht.
2. Die fremdstoffbedingte Lebervergrößerung könnte auf einem direkten Eingriff der Pharmaka oder der Metabolite in die Regulation von Zellwachstum und Zellteilung beruhen (SCHLICHT, J. et al., 1968).

3. Da es jedoch experimentell nie überzeugend gelungen ist, bei den beiden oben genannten Hypothesen eine Aktivierung proteinsynthetisierender Systeme nachzuweisen, wurde in letzter Zeit von einigen Untersuchern (SHUSTER, L. et al., 1966) die Ansicht vertreten, daß der fremdstoffinduzierten Lebervergrößerung nicht die Steigerung anaboler Mechanismen, sondern die Hemmung kataboler Reaktionen zugrunde liegt. In Untersuchungen von SHUSTER fand diese Annahme ihre Bestätigung. Der Autor konnte nachweisen, daß die Halbwertszeit von in Leberenzyme inkorporiertem C 14-Leucin durch Phenobarbital-Behandlung erheblich verlängert wird. Aus diesem Ergebnis wurde gefolgert, daß das Pharmakon eine Hemmung des Abbaus von markiertem Enzym-Protein bewirkt. Diese Interpretation ist jedoch nicht voll überzeugend, denn das beobachtete Phänomen könnte ebenso darauf beruhen, daß das Enzym-Protein mit unveränderter Geschwindigkeit abgebaut wird und daß das freiwerdende C 14-Leucin durch eine gesteigerte Synthese verstärkt in neues Protein inkorporiert wird (ARIAS, J.M. et al., 1969). Experimentelle Hinweise dafür wurden von ARIAS und SCHIMKE durch Bestimmung analoger Analysen der Protein-Halbwertszeit unter Anwendung markierter Aminosäuren erbracht, die nicht mehr reutilisiert werden.

Eine Entscheidung über die Realität dieser drei hypothetischen Wirkungsmechanismen war von Untersuchungen zu erwarten, in denen die Beeinflussung der durch Pharmaka bedingten Lebervergrößerung und der ihr zugrunde liegenden Enzymgehaltszunahmen durch Hemmstoffe der Protein-, der RNS- und der DNS-Synthese geprüft werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde deshalb geprüft, ob die fremdstoffinduzierte Lebervergrößerung und die Gehaltszunahme mikrosomaler Leberenzyme durch gleichzeitige

Anwendung der Synthesehemmstoffe Actinomycin, Actidion, Puromycin, Chloramphenicol und Mitomycin gehemmt werden können. Der zelluläre Angriff dieser Hemmstoffe ist in dem Schema der Abb. 1 dargestellt.

Actinomycin D hemmt die DNS-abhängige Synthese von RNS; nach neueren Untersuchungen besonders empfindlich die ribosomale RNS, in höherer Dosierung auch die m-RNS (Störung der Transkription)

Actidion hemmt die Matrizen-Funktion der m-RNS;

Puromycin und Chloramphenicol hemmen auf verschiedenem Wege die Synthese von Protein an der RNS-Matrize (Störung der Translation).

Mitomycin unterbindet die Replikation der DNS.

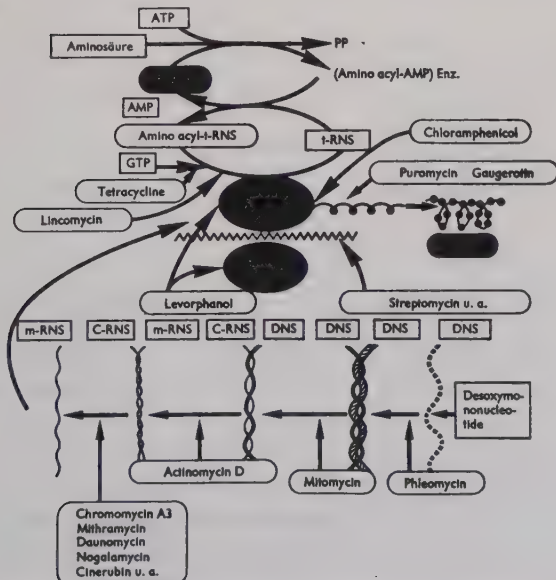


Abb. 1: Angriffspunkte der verschiedenen Antibiotika in der Nukleinsäure- und Protein-Biosynthese.

Mit diesen Hemmstoffen lassen sich also die Reaktionen des generativen Zellstoffwechsels - die DNS-Replikation, die Translation und die Transkription - auf allen Stufen unterbinden. Die Wirksamkeit oder die Wirkungslosigkeit dieser Substanzen müßten deshalb Folgerungen auf die kausalen Mechanismen der fremdstoffinduzierten Lebervergrößerung zulassen.

B. Methodik

I. Tiermaterial und Tierhaltung.

Die Versuche wurden mit männlichen Albinomäusen aus der Zucht NMRI Kisslegg/Allgäu durchgeführt.

Das Gewicht der Mäuse lag nach Eintreffen vom Züchter zwischen 25 und 35 g. Bis zum Beginn der Versuche wurden die Tiere etwa eine Woche lang an die Stall- und Ernährungsbedingungen unseres Instituts gewöhnt. Die Mäuse wurden mit Sniff-Trockenfutter der Fa. Intermast, Brockhoevel, gefüttert und erhielten Trinkwasser aus Saugflaschen ad libitum. Der Tierstall war klimatisiert und von 7 bis 17 Uhr künstlich beleuchtet.

II. Präparate und Applikationsweise.

Die Untersuchungen wurden mit folgenden Substanzen durchgeführt:

Phenobarbital-Na ^(R)	Merck	150 mg/kg p.o. (0,1 % i. Trinkwasser)
Phenobarbital-Na ^(R)	Merck	100 mg/kg s.c., i.p.
Actidion rein ^(R)	Serva	100 mg/kg i.p.
Actinomycin D		500 γ /kg i.p.
= Actinomycin C ₁ ^(R)	Serva	
Mitomycin C ^(R)	Serva	10 mg/kg i.p.
Paraxin (Hemisuccinat)		500 mg/kg i.p.
Puromycin ^(R)	Serva	10 mg/kg i.p.
Hexobarbital		150 mg/kg i.p.
= Evipan ^(R)	Bayer	

Die Substanzen wurden, sofern nicht anders angegeben, mit Tuberkubinspritzen intraperitoneal (i.p.) verabreicht. Die Lösung erfolgte in aqua bid. (Ampuwa^R) bzw. in 0,9 %

Kochsalzlösung (Actidion). Phenobarbital wurde subcutan (s.c.) und intraperitoneal (i.p.) appliziert oder 0,1 % im Trinkwasser (p.o.) gelöst. In Vorversuchen war ermittelt worden, daß die Tiere sehr konstant 0,2 ml Wasser pro Tag pro 1 g Körpergewicht (= KG) trinken. Bei der gewählten Lösungskonzentration wurden demnach 150 mg/kg KG am Tag aufgenommen.

III. Gewebsentnahme und Extraktzubereitung

1. Gewebsentnahme

Die Tiere wurden gewogen und mit einem Scherenschlag dekapitiert. Nach vollständiger Ausblutung wurde die Leber entnommen und gewogen. Bei der Präparation entfernten wir die Gallenblase.

2. Aufbereitung des Extraktes

1 g Leber wurde in 10 ml Saccharose-Lösung 0,25 Mol pH 7.2 mit Hilfe eines Homogenisators nach Potter homogenisiert. Die Saccharose-Lösung hatte eine Temperatur von etwa 3° C.

Saccharose-Lösung zur Fraktionierung:

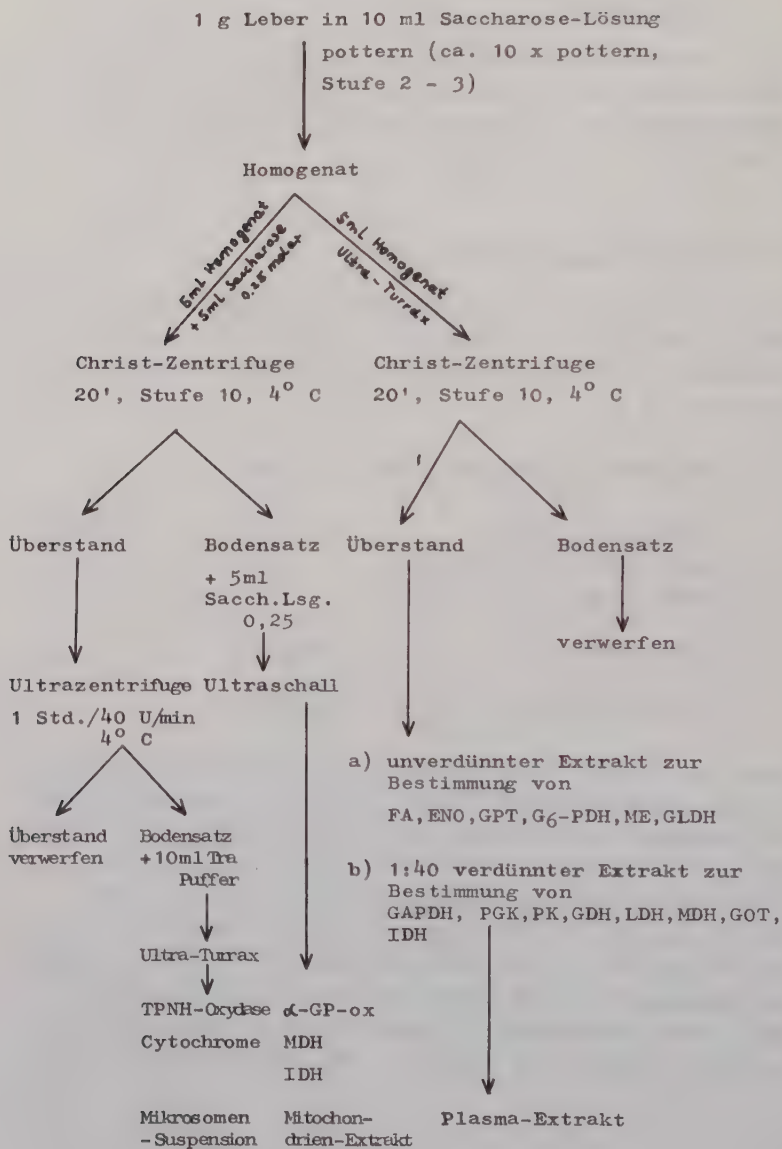
Saccharose pro Inj.	85,5 g	0,25 Mol
Aethylendiamintetraacetat (EDTA Titriplex III Merck)	3,7 g	0,1 Mol

Aqua bidest ad 1000,0 g

Einstellung auf pH 7.2 mit 1 n NaOH.

Nach dem Pottern wurde das Homogenisat halbiert (s. Schema S. 10). Die eine Hälfte wurde in einem Ultra-Turrax zur vollständigen Freisetzung der plasmatischen Enzyme 10 sec. bei maximaler Drehzahl und anschließend bei 10.000 g 20 Minuten zentrifugiert. Dieser "Plasmaextrakt" wurde zur Bestimmung der plasmatischen Enzyme eingesetzt. Die andere Hälfte des Potterhomogenates wurde zur Gewinnung von Mitochondrien und Mikrosomen weiter ausgearbeitet. Nach Zugabe von weiteren 5 ml 0,25 mol. Saccharoselösung wurde in einer Christ-Zentrifuge bei 10.000 g 20 Minuten

Schema zur Aufbereitung der Extrakte



lang im Kältelabor ($+ 4^{\circ} \text{C}$) zentrifugiert. Die sedimentierten Kerne und Mitochondrien wurden nach Abgießen des Überstandes in 5 ml Saccharose-Lösung (0,25 mol) aufgenommen und mit einem Ultraschall-Gerät resuspendiert. Zum Schutz gegen Erwärmung wurde das Gefäß dabei mit einem Eismantel gekühlt. In diesem "Mitochondrien"-Extrakt wurden die mitochondrialen Enzyme bestimmt.

Der Überstand wurde zur Gewinnung der Mikrosomen 1 Stunde lang bei 105.000 g in einer Ultrazentrifuge (MSE SS 50, Rotor 2408, 8 x 25 ml) bei 4°C sedimentiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurde das Sediment in 10 ml Tra-Puffer pH 7.6 mit einem Ultra-Turrax resuspendiert und zur Bestimmung der mikrosomalen Enzyme und Cytochrome verwandt.

Zusammensetzung des Tra-Puffers:

Triaethanolaminhydrochlorid	32,70 g	200 mM
EDTA (Titriplex III)	1,86 g	
Aqua bidest ad	1.000,00 g	

Einstellen auf pH 7.6 mit 1 n NaOH.

IV. Bestimmung der Enzymaktivitäten

Die Enzymaktivitäten wurden photospektrometrisch mit Hilfe der optischen Tests nach WARBURG und BÜCHER (WARBURG 1938, BEISENHERZ et al. 1953, BERGMETTER 1962) bestimmt. Die Messungen erfolgten in 10 mm OS Küvetten in einem Zeiss-Photometer PMQ II bei einer Wellenlänge von 340 mμ; die Bestimmung der α-Glycerophosphatoxydase bei einer Wellenlänge von 550 mμ. Der Küvettenhalter des Photometers war mit Hilfe eines Thermostaten auf 25° C konstant temperiert. Die zu den Tests erforderlichen Substanzen wurden mit automatischen Eppendorf-Pipetten - Typ Marburg - in die Küvette gebracht. Die Extrakte wurden mit 0,1 ml Mikropipetten exakt einpipettiert. Sie wurden so verdünnt, daß eine optimale Reaktionsgeschwindigkeit erhalten wurde.

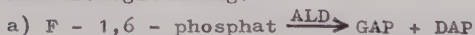
a) Testansätze

Die einzelnen Tests wurden nach folgenden Reaktionsgleichungen in den nachfolgenden Ansätzen durchgeführt:

DPNH-abhängige Enzyme:

1. FA = Fruktosaldolase

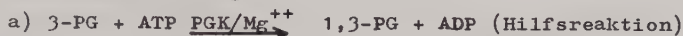
Reaktionsgleichung:



DPNH	0,3 mM	0,02 ml	c = 10
TRA-Puffer	pH 7.6	0,94 ml	
TIM		0,005 ml	
GDH		0,005 ml	
FDP	4.0 mM	0,01 ml	c = 162,4
Plasmaextrakt (unverdünnt)		0,02 ml	
Start mit FDP			

2. GAP-DH = Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase

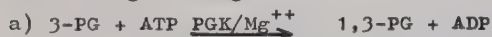
Reaktionsgleichung:



TRA-Puffer	pH 7.6	0.835 ml	
DPNH	0,3 mM	0.02 ml	c = 10
Glutathion	2,4 mM	0,02 ml	c = 36,8
ATP	1,5 mM	0,04 ml	c = 22,5
MgSO ₄	3,3 mM	0,02 ml	c = 40,6
PGK	100 IE	0,005 ml	
3-Phosphoglycerat		0,02 ml	c = 188
Plasmaextrakt (1:40 verdünnt)		0,04 ml	
Start mit 3-PG			
Glutathion wurde jeden Tag neu angesetzt.			

3. PGK = Phosphoglyceratkinase

Reaktionsgleichung:



TRA-Puffer	pH 7.6	0,845 ml	
DPNH	0,3 mM	0,02 ml	c = 10
Glutathion	1,2 mM	0,01 ml	c = 36,8
ATP	1,5 mM	0,04 ml	c = 22,5
MgSO ₄	6,6 mM	0,04 ml	c = 40,6
GAP-DH	100 IE	0,005 ml	
3-PG	7,0 mM	0,02 ml	c = 188
Plasma-Extrakt (1:40 verdünnt)		0,02 ml	
Start mit 3-PG			

4. ENO = Enolase

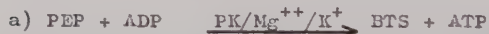
Reaktionsgleichung:



TRA-Puffer	pH 7.6	0,875 ml	
MgSO ₄	8,0 mM	0,02 ml	c = 197
KCl		0,02 ml	c = 5,59
LDH (1:10 verdünnt)	40 IE	0,01 ml	
PK	80 IE	0,01 ml	
2-PG		0,02 ml	c = 36
ADP	2,5 mM	0,01 ml	c = 62
DPNH	0,3 mM	0,02 ml	c = 10
Plasma Extrakt unverdünnt		0,02 ml	
Start mit Extrakt			

5. PK = Pyruvatkinase

Reaktionsgleichung



KNa ₂ PO ₄ -Puffer	pH 7.2	0,875 ml	
DPNH	0,3 mM	0,02 ml	c = 10
ADP	2,5 mM	0,01 ml	c = 62
MgSO ₄	8,0 mM	0,01 ml	c = 197,2
KCl	7,5 mM	0,02 ml	c = 281
LDH (1:10 verdünnt)	40 IE	0,005 ml	
PEP	0,8 mM	0,01 ml	c = 37,2
Plasma-Extrakt (1:40 verdünnt)		0,05 ml	
Start mit PEP			

6. GDH = Glycerophosphat-Dehydrogenase

Reaktionsgleichung:



TRA-Puffer	pH 7.6	0,89 ml	
TPE		0,01 ml	
DPNH	0,3 m	0,02 ml	c = 10
Plasma-Extrakt (1:40 verdünnt)		0,08 ml	
Start mit TPE			

7. LDH = Lactatdehydrogenase

Reaktionsgleichung:



TRA-Puffer	pH 7.6	0,96 ml	
DPNH	0,3 mM	0,01 ml	c = 10
Na-Pyruvat	2,4 mM	0,01 ml	c = 5,5
Plasma-Extrakt (1:40 verdünnt)		0,02 ml	
Start mit Na-Pyruvat.			

8. MDH = Malatdehydrogenase

Reaktionsgleichung:



TRA-Puffer	pH 7.6	0,92 ml	
DPNH	0,3 mM	0,04 ml	c = 10
OA	0,2 mM	0,02 ml	c = 2,6
Plasma-Extrakt (1:40 verdünnt)		0,02 ml	
Start mit OA.			

Die Oxalessigsäure ist in wässriger Lösung instabil und wurde deshalb an jedem Versuchstag neu angesetzt.

9. GPT = Glutamat-Pyruvat-Transaminase

Reaktionsgleichung:

- a) α -KG + l-Alanin $\xrightarrow{\text{GPT}}$ BTS + Glutamat
 b) BTS + DPNH $\xrightarrow{\text{LDH}}$ Malat + DPN^+ (Hilfsreaktion)

K- Na_2 -Puffer	pH 7.2	100 mM	0,915 ml	
DPNH	0,3 mM		0,02 ml	c = 10
l-Alanin	10 mM		0,02 ml	c = 89
LDH (1:10 verdünnt)	40 IE		0,005 ml	
α -KGS	10 mM		0,02 ml	c = 73
Plasma-Extrakt (unverdünnt)			0,02 ml	
Start mit α -KGS				

10. GOT = Glutamat-Oxalacetat-Transaminase

Reaktionsgleichung:

- a) α -KGS + l(3) Aspartat $\xrightarrow{\text{GOT}}$ Glutamat + Oxalacetat
 b) Oxalacetat + DPNH $\xrightarrow{\text{MDH}}$ Malat + DPN^+

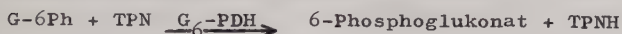
K- Na_2 -Puffer	pH 7.2	100 mM	0,855 ml	
DPNH	0,3 mM		0,02 ml	c = 10
Aspartat	10,0 mM		0,02 ml	c = 65
MDH			0,005 ml	
α -KGS	10,0 mM		0,02 ml	c = 73
Plasma-Extrakt (1:40 verdünnt)			0,08 ml	

Asparaginsäure und α -Ketoglutarsäure wurden mit 1 n NaOH auf einen pH von 7.2 eingestellt.

TPN-abhängige Enzyme:

1. G-6-PDH = Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase (Zwischenferment)

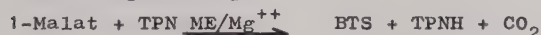
Reaktionsgleichung:



TRA-Puffer	pH 7.6	0,9 ml	
TPN	0,4 mM	0,04 ml	c = 7,5
Glucose-6-phosphat	2,0 mM	0,01 ml	c = 60,8
Plasma-Extrakt (unverdünnt)		0,05 ml	
Start mit Glucose-6-phosphat			

2. ME = Malic Enzyme

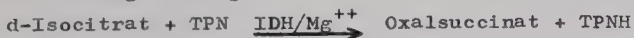
Reaktionsgleichung:



TRA-Puffer	pH 7.6	0,90 ml	
TPN	0,4 mM	0,02 ml	c = 7,5
MgSO ₄	8,0 mM	0,01 ml	c = 197,2
1-Malat	1,0 mM	0,02 ml	c = 6,7
Plasma-Extrakt (unverdünnt)			
Start mit 1-Malat			

3. IDH = Isocitrat-Dehydrogenase

Reaktionsgleichung:



TRA-Puffer	pH 7.6	0,83 ml	
TPN	0,4 mM	0,04 ml	c = 7,5
MgSO ₄	8,0 mM	0,01 ml	c = 197,2
d-1-Isocitrat	1,3 mM	0,02 ml	c = 23
Plasma-Extrakt (1:40 verdünnt)			
Start mit d-1-Isocitrat			

Mitochondriale Enzyme

1. α -GP - OX = α -Glycerophosphatoxydase

Reaktionsgleichung:



K-Na ₂ -PO ₄ -Puffer	pH 7.2	0,79 ml	
KCN	1 mM	0,02 ml	c = 3,25
MgSO ₄	8 mM	0,01 ml	c = 197,2
Cytochrom C		0,04 ml	c = 26
α -GP	4 mM	0,04 ml	c = 315
Mitochondrien-Extrakt (1:20 verdünnt)		0,1 ml	
Start mit α -Glycerophosphat			

!

2. GLDH

Glutamatdehydrogenase

Reaktionsgleichung:



TRA-Puffer	pH 7.6	0,84 ml	
DPNH	0,3 mM	0,02 ml	c = 10
NH ₄ Cl		0,1 ml	c = 100
α -KGS	10,0 mM	0,02 ml	c = 73
Gesamt-Extrakt (unverdünnt)		0,02 ml	
Start mit α -KGS			

Da die GLDH in der Leber nur mitochondrial vorkommt, wurde die Bestimmung im Gesamt-Extrakt durchgeführt.

3. MDH = Malatdehydrogenase

Die Bestimmung der mitochondrialen MDH wurde nach dem auf S. 15 aufgeführten Reaktionsschema durchgeführt; statt Gesamt-Extrakt wurden 0,04 ml Mitochondrien-Extrakt in einer Verdünnung 1:20 eingesetzt.

4. IDH = Isocitrat-Dehydrogenase

Zur Bestimmung der mitochondrialen IDH wurden von dem unverdünnten Extrakt 0,05 ml eingesetzt.

Reaktionsschema s. S. 17.

Mikrosomale Enzyme:

1. TPNH-Oxydase

K-Na ₂ -PO ₄ -Puffer	pH 7.2	1,4 ml	
TPNH	0,27 mM	0,2 ml	c = 2
Mikrosomen-Suspension		0,4 ml	
Start mit TPNH			

Zusammensetzung des Phosphat-Puffers nach Sørensen (pH 7.2)

1/15 mol KH ₂ PO ₄	28,5 ml
1/15 mol Na ₂ HPO ₄ · 2H ₂ O	71,5 ml

2. Cytochrom P-450

3. Cytochrom b5

Bestimmung durch Aufnahme der Differenzspektren in unverdünnter Mikrosomensuspension.

Ansätze und Methodik s. S. 20

b) Berechnung der Enzymaktivitäten

Die mit Hilfe eines TE-Wandlers aufgezeichneten linearen Extinktionsveränderungen wurden mit einer Schablone ausgewertet, auf der die Extinktionsänderung von 5 Minuten abzulesen war. Aus den gewonnenen Extinktionsveränderungen wurden unter Berücksichtigung der Verdünnung und des Extinktionskoeffizienten die Enzymaktivitäten in IE pro g Leber berechnet. Die Formel zur Berechnung lautet:

$$\frac{E/\text{min} \times \text{Verdünnungsfaktor}}{6,2} = \text{IE/g Leber}$$

Bei der Bestimmung von α GP-oxydase:

$$\frac{E/\text{min} \times \text{Verdünnungsfaktor}}{9,3 \times 2} = \text{IE/g Leber}$$

Die Enzymgehalte wurden für 1 g Leber und für die Gesamtleber eines 25 g schweren Tieres angegeben. Die Umrechnung auf die Gesamtleber erfolgte unter Berücksichtigung des relativen Lebergewichtes nach folgendem Verfahren:

$$\text{relatives Lebergewicht} = \frac{\text{absolutes Lebergewicht in mg}}{\text{Körpergewicht in g}}$$

Die Enzymgehalte der Gesamtleber eines 25 g schweren Tieres (IE L 25 gM) betragen demnach:

$$\text{IE/L25gM} = \text{IE} \times 25 \times \text{relatives Lebergewicht.}$$

c) Bestimmung und Berechnung von Cytochrom P-450 und Cytochrom b 5

In Anlehnung an die von OMURA und SATO (1964) beschriebene Methode werden die Cytochrome P-450 und b 5 durch Bestimmung der Differenzspektren in einem Analysengang ermittelt.

Die Methode beruht darauf, daß Cytochrom b 5 durch DPNH reduziert wird und im Differenzspektrum ein Maximum bei 424 m μ bildet, das bei reduziertem Cytochrom P-450 nicht vorhanden ist. Cytochrom P-450 bindet jedoch im reduzierten Zustand CO und besitzt dadurch im Differenzspektrum ein deutliches Maximum bei 450 m μ .

CO wurde in der Kipp'schen Apparatur aus erhitzter Schwefelsäure und Methanol entwickelt.

Meßansatz:

a) Cytochrom b 5

	Meßküvette	Kontrollküvette
Mikrosomensuspension	2,0 ml	2,0 ml
DPNH C=20	0,01 ml	-

Nach Durchmischen Aufnahme des Spektrums zwischen 600 und 380 m μ .

b) Cytochrom P-450

	Meßküvette	Kontrollküvette
DPNH	-	0,01 ml
CO-Sättigung (20 sec.durchblubbern)	CO	-
Zugabe einiger Körnchen Na ₂ S ₂ O ₄		Na ₂ S ₂ O ₄

Nach vorsichtigem Mischen erneute Aufnahme des Spektrums zwischen 600 und 380 m μ .

Die Differenzspektren der Mikrosomenfraktion wurden in dem registrierenden Spektralphotometer (DM R 21 der Fa. Zeiss) in 1 cm Quarzküvetten bei Zimmertemperatur gemessen.

Auswertung und Berechnung

Zur Auswertung wurden für Cytochrom b 5 die Extinktionsdifferenzen $\Delta E_{424-409}$ und für Cytochrom P-450 die Differenzen $\Delta E_{490-450}$ ermittelt.

Die absoluten Konzentrationen wurden unter Zugrundelegung des von OMURA und SATO (1964) angegebenen molaren Extinktionskoeffizienten von $185 \text{ cm}^{-1} \text{ mM}^{-1}$ für Cytochrom b 5 und von $91 \text{ cm}^{-1} \text{ mM}^{-1}$ für P-450 ermittelt. Unter Berücksichtigung der Verdünnung errechneten sich demnach folgende Extinktionsfaktoren:

$$b\ 5 = \Delta E - 108 = \mu\text{M Mol/g Fg}$$

$$P-450 = \Delta E - 219 = \mu\text{M Mol/g Fg}$$

(Fg = Leberfrischgewicht)

d) Bestimmung der Hexobarbital-Schlafzeit

Als Maß der Aktivität der mikrosomalen Metabolisierungsenzyme in vivo wurde die Abbaugeschwindigkeit von Hexobarbital (= Evipan^R) durch Ermittlung der Evipan-Schlafzeit bestimmt.

Wir verabreichten Hexobarbital als 5 % wässrige Lösung (150 mg/kg Körpergewicht) intraperitoneal. Da die Narkosedauer bei Mäusen von Tagesschwankungen abhängig ist, wurden in den Versuchen nicht vorbehandelte Kontrollgruppen unter gleichen Bedingungen angesetzt; ihre mittlere Schlafzeit setzten wir immer gleich 100 %, die Schlafzeit der vorbehandelten Tiere wurde auf diesen Wert bezogen.

Als Beginn der Narkose werteten wir den Verlust der Stellreflexe (= Einnahme der Seiten- bzw. Rückenlage). Die Narkose galt als beendet, wenn die Tiere die passive Seitenlage nicht mehr ertrugen und sich aufrichteten.

V. Statistische Auswertung

Die angewandten, statistischen Methoden entnahmen wir dem Lehrbuch von E. KREYSZIG (1965).

Die Berechnung erfolgte in der Zentralen Rechenanlage der Universität Marburg mit einem Telefunken-Rechner TR 4. Das Programm wurde in ALGOL geschrieben.

Die Berechnung der Streuung der Mittelwerte (= Standardabweichung = σ_M) erfolgte nach folgender Formel:

$$\sigma_M = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2}{(n-1) \cdot n}}$$

X_i = Enzymgehalte eines Versuches

$\bar{X}$ = Mittelwert der Enzymgehalte einer Versuchsgruppe

n = Anzahl der Tiere einer Versuchsgruppe

$2 \times \sigma_M$ = Streubreite

In dem Bereich $\bar{X} \pm 2 \cdot \sigma_M$ sind 95 % aller Mittelwerte zu erwarten.

Die Signifikanz wurde nach dem Mann-Whitney-Test ermittelt, der zum Vergleich zweier unabhängiger Stichproben dient, die hinsichtlich ihrer Mittelwerte aus nicht normal verteilten Grundgesamtheiten stammen können.

Berechnet wird die Irrtumswahrscheinlichkeit α in %.

Signifikanz liegt vor bei

$$\alpha \leq 5 \% \quad +$$

hohe Signifikanz bei

$$\alpha \leq 1 \% \quad ++$$

sehr hohe Signifikanz bei

$$\alpha \leq 0,1 \% \quad +++$$

"Tendenz" bei

$$\alpha \leq 10 \% \quad (+)$$

In den Abbildungen und Tabellen wird entweder die genaue Irrtumswahrscheinlichkeit α in Prozent angegeben oder meistens der Wahrscheinlichkeitsbereich wie oben aufgeführt durch verschiedene Anzahl von (+) gekennzeichnet.

C. Experimenteller Teil

I. Beeinflussung von Lebergröße und Enzymgehalten der Leber durch Phenobarbital.

Phenobarbital erwies sich wegen seiner schnell einsetzenden und sehr ausgeprägten Wirkung als besonders geeignete Substanz zum Studium des Induktionsmechanismus der mikrosomalen Metabolisierungsenzyme.

Die meisten Untersuchungen über die Induktion der Mikrosomenenzyme und über die damit verbundene Vermehrung der enzymtragenden Strukturen des glatten endoplasmatischen Reticulums sind deshalb mit dieser "klassischen" Induktionssubstanz durchgeführt worden (Remmer, 1963).

Auch die einer starken mikrosomalen Induktion folgende Zunahme der Lebergröße tritt besonders ausgeprägt nach Applikation von Phenobarbital auf. Zeitlicher Verlauf und quantitatives Ausmaß der Lebergewichtszunahme sind dabei sehr konstant und gut vergleichbar. Der mit der Lebervergrößerung einhergehende Anstieg auch der extramikrosomalen Enzyme wurde deshalb ebenfalls besonders eingehend am Beispiel der durch Phenobarbital induzierten Lebervergrößerung analysiert (KUNZ et al., 1966, MIEHE, 1966, HERBOLD, 1969). Wir konnten die in diesen Arbeiten niedergelegten Daten bei unseren Untersuchungen bestätigen. In Tabelle 1 und 2 sind die Resultate aller eigenen Versuche mit Phenobarbital zusammengestellt.

In Abhängigkeit von der Applikationsart der Substanz fanden sich dabei geringe Unterschiede im quantitativen Ausmaß von Lebervergrößerung und Enzymanstieg. Die qualitativen Veränderungen waren identisch. Um das qualitative Verhalten der Enzym Spiegel während des induzierten

Tab. 1	n	Kontrolle IE/gL	$\pm$ GM	n	Phenobarb. IE/gL	$\pm$ GM	Δ %
rel. LG	64	51,62		61	67,76		+ 31 %
TPNH _{ox}	55	0,15	0,052	62	0,36	0,180	+140,0
FA	48	7,93	2,500	50	7,82	2,089	- 1,4
GAPDH	37	102,70	46,039	40	103,28	42,578	+ 0,3
PGK	39	261,37	80,918	44	274,93	78,181	+ 5,2
ENO	28	8,09	3,330	29	8,57	3,091	+ 5,9
PK	44	29,79	9,883	48	27,58	9,674	- 7,4
GDH	49	36,25	11,764	53	29,87	9,922	- 17,6
LDH	49	256,08	78,119	53	207,42	62,145	- 19,0
MDH	48	417,40	124,405	53	396,14	109,816	- 5,1
ZF	51	0,96	0,376	55	0,89	0,215	- 7,3
ME	51	2,26	1,218	55	1,88	0,812	- 6,8
IDH	51	26,98	9,286	55	26,72	13,399	- 1,0
GOT	24	19,32	8,994	25	18,39	4,927	- 4,8
GPT	31	6,29	2,791	35	6,47	2,849	+ 2,9
ALP _{ox}	53	2,74	1,221	56	2,06	0,963	- 24,8
IDH _{Mi}	51	0,95	0,301	55	0,98	0,256	+ 3,15
MDH _{Mi}	51	37,60	15,576	55	37,04	19,233	- 1,5
GLDH	47	7,79	3,568	51	6,20	3,755	- 20,4

Tab. 1

Beeinflussung der Enzymgehalte der Leber durch 4-tägige Applikation von Phenobarbital.

Angabe der Enzymaktivitäten in IE/g Lebergewicht (= IE/gL).

% Veränderungen Δ % bezogen auf Kontrollwerte.

Tab. 2

	n	Kontrolle IE/LG 25	$\pm \sigma M$		n	Phenobarb. IE/LG 25	$\pm \sigma M$	$\Delta \%$
rel.LG	64	51,62				67,76		+ 31 %
TPNH _{ox}	55	0,193	0,070		62	0,632	0,395	+227,46
FA	48	10,24	3,283		50	13,196	3,597	+ 28,9
GAPDH	37	133,45	65,407		40	176,79	85,792	+ 32,5
PGK	39	336,92	108,921		44	475,25	189,065	+ 41,1
ENO	28	10,33	4,152		29	14,41	5,359	+ 39,5
PK	44	38,41	13,505		48	47,43	22,893	+ 23,5
GDH	49	46,54	15,005		53	49,22	13,562	+ 5,8
LDH	49	327,14	93,271		53	344,56	95,369	+ 5,3
MDH	48	533,88	160,068		53	668,55	215,983	+ 25,2
ZF	51	1,23	0,514		55	1,52	0,381	+ 23,6
ME	51	2,91	1,591		55	3,19	1,470	+ 9,6
IDH	51	34,71	11,73		55	45,52	23,203	+ 31,14
GOT	24	25,46	12,811		25	32,90	14,152	+ 29,2
GPT	31	8,23	3,790		35	11,66	6,425	+ 41,7
α -GP _{ox}	53	3,59	1,660		56	3,43	1,537	- 4,5
IDH _{Mi}	51	1,22	0,355		55	1,63	0,46	+ 33,6
MDH _{Mi}	51	48,63	19,66		55	61,86	32,138	+ 27,2
GLDH	47	10,05	4,561		51	10,32	6,727	+ 2,7

Tab. 2

Beeinflussung der Enzymgehalte der Leber durch 4-tägige Applikation von Phenobarbital.

Angabe der Enzymaktivitäten in IE pro Gesamtleber der 25 g Maus (= LG 25).

Leberwachstums an einem umfangreichen Kollektiv darstellen zu können, wurden in den Tabellen unabhängig von der Applikationsart alle Werte zusammengefaßt.

In Tab. 1 sind die absoluten und prozentualen Veränderungen der Enzymkonzentrationen pro g Leber dargestellt;

Tab. 2 bringt die gleichen Größen, berechnet für die Gesamtleber eines 25 g schweren Tieres.

Wie in den vorausgegangenen Untersuchungen findet sich auch hier schon nach 4-tägiger Phenobarbitaleinwirkung ein starker Anstieg der TPNH-Oxidase bis zu einer Erhöhung von 400 %.

Etwa dem Gewichtsanstieg der Leber entsprechend sind auch die Gehalte der meisten plasmatischen und mitochondrialen Enzyme erhöht. Einen besonders starken, die Lebergewichtszunahme übersteigenden Anstieg zeigen die PGK, die GAPDH, die Enolase und die IDH. Die Konzentrationen dieser Enzyme sind deshalb gering erhöht.

Ebenfalls in Übereinstimmung mit den früheren Untersuchungen wurde bei LDH und GDH umgekehrt eine Konzentrationsabnahme gefunden.

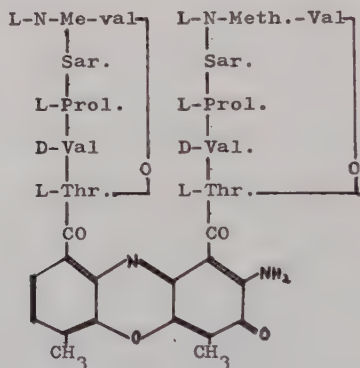
Aus der Darstellung der Lebergesamtgehalte der Tabelle 2 ist ersichtlich, daß die Konzentrationsabnahme offenbar durch das Ausbleiben einer dem Gewichtsanstieg adäquaten Enzymmehrsynthese bedingt ist, nicht durch Enzymverlust; die Enzymgehalte der vergrößerten Leber entsprechen annähernd den Gehalten in der nicht induzierten Leber. Das gleiche gilt für die mitochondrialen Enzyme α -GP-OX und GLDH. Die mitochondrialen IDH und MDH zeigen dagegen keine erniedrigten Konzentrationen, demnach erhöhte Gesamtgehalte.

II. Beeinflussung der Phenobarbitalwirkung durch Hemmstoffe der Protein- und Nucleinsäuresynthese.

1. Wirkung von Actinomycin D (C₁)

Actinomycin D gehört zu einer Gruppe von Antibiotika, die bakteriostatische, zytostatische und Antitumoreigenschaften besitzen. Es wurde 1940 von WAKSMAN und WOODRUFF (1940) aus Actinomyceten isoliert.

Strukturformel des Actinomycin D (C₁) (GOLDBERG, 1964).



Actinomycin D hemmt die Proteinsynthese auf der Transkriptionsebene (s. Abb. 1).

Als Wirkungsmechanismus wird eine Komplexbildung von Actinomycin mit doppelsträngiger DNS angenommen. Eine Bindung an einsträngige DNS oder RNS erfolgt nicht. (ROSEN, 1964). Nach Röntgenbeugungsuntersuchungen (DELLWEG, 1967) wird das Antibiotikum durch Wasserstoffbrücken an Guanin angelagert und befindet sich in der kleinen Furche der DNS-Doppelhelix.

Der Actinomycin-DNS-Komplex besitzt noch seine volle Wirksamkeit als Matrizie für die DNS-Polymerase. Die DNS-Replikation in der Zelle läuft daher ungehindert weiter.

Die DNS-abhängige RNS-Synthese wird dagegen vollständig gehemmt.

In den ersten Untersuchungen war angenommen worden, daß die Neubildung von m-RNS von der Hemmung besonders stark betroffen wird. Neuere Befunde machten jedoch wahrscheinlich, daß die Synthese von r-RNS eine noch höhere Sensitivität besitzt (HAMILTON, 1963, GOLDBERG, 1964).

Durch niedrige Dosen von Actinomycin wird offenbar bevorzugt die r-RNS-Synthese inhibiert. Obwohl demnach die Bildung aller drei an der DNS-Matrize kopierten RNS-Arten gehemmt wird, beruht das schnelle Sistieren der Proteinsynthese vorwiegend auf der fehlenden Nachlieferung der sehr kurzlebigen m-RNS.

Da bei unseren Untersuchungen vor allem entschieden werden sollte, ob der durch Phenobarbital bedingte Anstieg der Enzymgehalte auf einer Steigerung der vom Kern regulierten Synthese-Prozesse beruht, wählten wir für die Versuche Actinomycin-Dosen, durch die mit Sicherheit auch die Synthese der m-RNS unterbunden wurde.

Wir richteten uns dabei nach den Angaben von Wettstein et al. (1963) und applizierten 500 μ g/Tiergewicht durch intraperitoneale Injektion.

a) Beeinflussung der Induktion mikrosomaler Enzyme.

Von CONNEY (1963, 1960) und GELBOIN (1963) wurde bereits nachgewiesen, daß die Induktion der mikrosomalen 3,4-Benzpyrenhydroxylase und der N-Demethylase durch Actinomycin gehemmt werden kann. In Übereinstimmung damit fanden wir bei unseren Induktionsversuchen mit Phenobarbital, daß der Anstieg der mikrosomalen TPNH-Oxidase und der Cytochrome P-450 und b 5 inhibiert wird. Die gesteigerte Synthese dieser Enzyme verläuft demnach über eine erhöhte RNS-Synthese im Kern.

In Tabelle 3a sind die Ergebnisse dieser Versuche zusammengestellt. Nach 3-tägiger Phenobarbital-Applikation steigen

Tabelle 3

	Medikation pro kg pro die	n Tage	TPNH-ox			Cytochrom P-450			Cytochrom b 5		
			IE/g FG	Δ %	Σ E	m μ Mol/ g F	Δ %	Σ E	m μ Mol/ g F	Δ %	Σ E
Kontroll- gruppe			0,13		0,010344	8,54		0,60514	3,29		0,364
Pheno- barbital	150 mg p.o.	3	0,55	+323,1		37,78	+342,4		7,02	+113,4	
Actino- mycin	500 γ i.p.	3	0,11	- 15,4		3,83	- 55,2		2,16	- 34,3	
Ph.+Act.	150 mg p.o. 500 γ i.p.	3	0,26	+100		10,40	+ 21,8		3,78	+ 14,9	

a)

-30-

	Medikation	n Tage	IE/L 25 g M	Δ %	Σ E	m μ Mol/L 25 g M	Δ %	Σ E	m μ Mol/L 25 g M	Δ %	Σ E
Kontroll- gruppe			0,17		0,016031	11,28		0,94968	4,35		0,50378
Pheno- barbital	150 mg p.o.	3	0,91	+435,3		62,88	+457,4		11,65	+167,8	
Actino- mycin	500 γ i.p.	3	0,10	- 41,2		3,92	- 65,2		2,10	- 51,7	
Ph.+Act.	150 mg p.o. 500 γ i.p.	3	0,27	+ 58,8		11,70	+ 3,72		4,26	- 2,1	

b)

Tab. 3 a und b: Beeinflussung des Anstiegs mikrosomaler Enzyme nach Phenobarbital-Induktion durch Actinomycin.

a) Enzymkonzentrationen pro g Leber

die Konzentrationen der TPNH-oxidase um 323 %, des Cytochrom P-450 um 342 % und des b 5 weniger ausgeprägt um 113 % an. Die Gesamtgehalte der mikrosomalen Enzyme in der Leber (Tab. 3b) sind durch den zu diesem Zeitpunkt schon deutlichen Gewichtsanstieg noch stärker erhöht. Die Gesamtzunahme der TPNH-Oxidase beträgt 435 %, des Cytochrom P-450 460 % und des Cytochrom b 5 180 %.

Nach dreimaliger Applikation von je 500 μ /kg Actinomycin an drei aufeinanderfolgenden Tagen wurden bei der Untersuchung 24 Stunden nach der letzten Actinomycin-Gabe die Konzentrationen und die Gesamtgehalte aller mikrosomalen Enzyme sicher erniedrigt gefunden. Die Erniedrigung des Cytochrom P-450-Gehaltes war dabei deutlich stärker als die der TPNH-Oxidase. Das dürfte darauf zurückzuführen sein, daß Cytochrom P-450 mit einer Halbwertszeit von 15 Stunden die höhere Umsatzgeschwindigkeit besitzt. Eine Hemmung der Neusynthese muß deshalb hier zur stärkeren Konzentrationsabnahme führen.

Der durch Phenobarbital induzierte Anstieg der mikrosomalen Enzyme wird dementsprechend durch Actinomycin sehr stark gehemmt. Auch hier wird die Steigerung der Cytochrom P-450- und b 5-Gehalte am stärksten, die der TPNH-Oxidase zwar ebenfalls deutlich, aber weniger ausgeprägt inhibiert. Die Prüfung der Aktivität der mikrosomalen Metabolisierungssysteme in vivo mit Hilfe des Hexobarbital (Evipan^R) Schlafzeit-Tests ergab bei vergleichbar behandelten Gruppen vollkommen analoge Resultate. Nach Vorbehandlung mit Phenobarbital wurde durch die Beschleunigung des mikrosomalen Evipan-Abbaus eine Verkürzung der Schlafzeit um 73 % gefunden. Durch gleichzeitige Applikation von Actinomycin konnte diese Wirkung praktisch vollständig aufgehoben werden (Tab. 4).

Die mit Actinomycin allein behandelten Tiere dieser Gruppe erwachten als Folge der starken Verminderung der Metabolisierungsenzyme nicht mehr aus der Narkose und kamen ad exitum.

	n	Medikation pro kg Körper- gewicht	Behandl. n Tage	Evipan- Schlaf- zeit	% Verän- derun- gen
Kontroll- gruppe	5			79,4	
Phenobarbi- tal sc.	5	2 x 50 mg	3	21,6	- 73
Actinomycin i.p.	3	500 μ	3	Exitus d.Tiere	--
Phenobarbi- tal sc + Actinomy- cin i.p.	4	2 x 50 mg + 500 μ	3 3	72,6	- 8,6

Tab. 4

Durchführung des Schlafversuchs 16 Stunden nach der letzten Phenobarbital- und 24 Stunden nach der letzten Actinomycin-Applikation.

In beiden Versuchsanordnungen zeigte sich also übereinstimmend, daß die Konzentrationen der mikrosomalen Enzyme und damit auch der Evipanabbau in der Phenobarbital-Actinomycin-Gruppe im Vergleich mit dem Phenobarbital-Kollektiv stark erniedrigt, gegenüber der Kontrollgruppe jedoch gering und gegenüber der Actinomycin-Gruppe deutlich erhöht ist.

Die Induktion der Enzyme durch Phenobarbital wird demnach durch die gewählte Actinomycin-Dosis entweder nicht vollständig unterbunden oder die Wirkungsdauer des Antibiotikums wird durch Phenobarbital herabgesetzt.

Da es in dem Initialstadium der Phenobarbital-Einwirkung auch zu einer Steigerung der DNS-Synthese, zu Polyploidisierung und zu vermehrter Zellteilung kommt, erscheinen beide Möglichkeiten denkbar.

Für eine Verminderung der Wirkungsdauer von Actinomycin sprechen daraufhin durchgeführte Versuche, in denen Enzymgehalte und Evipan-Schlafzeit 48 Stunden nach der letzten Actinomycingabe bestimmt wurden.

Wegen des hohen Gesamtumsatzes der Maus hält die Actinomycineinwirkung nur kurze Zeit an. Schon 2 Tage nach der letzten Applikation ist sie bereits weitgehend abgeklungen und es setzen intensive Restitutionsprozesse ein. (Tab. 5a, 5b). Auf Grund der hohen "turn-over"-Rate zeigen sie sich besonders bei den beiden Cytochromen. Ihre Gehalte liegen bei den ausschließlich mit Actinomycin behandelten Tieren sogar über den Werten der gleichzeitig untersuchten Kontrolltiere (Tab. 5b).

Die TPNH-Oxidase, deren Aktivität unter Actinomycin wesentlich langsamer ablief, wird nach Absetzen der Actinomycingaben auch langsamer restituiert. In der Actinomycin-Gruppe sind Konzentrationen und Gehalte noch erniedrigt. Bei gleichzeitiger Phenobarbitalinduktion werden jedoch auch hier schon Werte erreicht, die über denen des Kontrollkollektivs liegen.

a)

	Medikation pro kg pro die	n Tage	TPNH-ox			Cytochrom P-450			Cytochrom b 5		
			IE/g FG	Δ %	SE	μMol/g F	Δ %	SE	μMol/g F	Δ %	SE
Kontrolle n = 10			0,13		±0,010344	8,54			3,29		0,364
Pheno- barbital s.c.	2x50 mg	3	0,20	+ 53,84		26,28	+207,7		9,72	+195,4	
Actino- mycin	500 Y	2	0,08	- 38,5		17,52	+105,2		6,48	+ 96,9	
Pheno- barbital + Actino- mycin sc/ i.p.	2x50 mg + 500 Y	3 2	0,24	+ 84,6		27,92	+226,9		8,91	+170,8	

b)

	Medikation	n Tage	IE/L 25 g M	Δ %	SE	μMol/L 25 g M	Δ %	SE	μMol/L 25 g M	Δ %	SE
Kontrolle n = 10			0,17		±0,016031	11,28			4,35		0,50378
Phenobar- bital s.c.	2x50 mg	3	0,29	+ 70,6		38,42	+240,6		14,19	+226,2	
Actino- mycin i.p.	500 Y	2	0,09	- 47,1		20,41	+ 80,9		7,75	+ 78,2	
Act. + Ph. i.p./s.c.	500 Y + 2x50 mg	2 3	0,40	+135,3		45,30	+301,6		14,49	+233,1	

Tabelle 5a und b: Beeinflussung des Anstiegs mikrosomaler Enzyme nach Phenobarbital-Induktion durch Actinomycin.

Entsprechende Ergebnisse brachten die Schlafzeitversuche mit Hexobarbital (Tab. 6).

In der Actinomycin-Gruppe ist die Schlafzeit trotz der nachgewiesenen erhöhten Cytochrom-Gehalte verlängert; hier wird der Evipan-Abbau möglicherweise durch die noch erniedrigten Konzentrationen an TPNH-Oxidase limitiert. In der Phenobarbital-Actinomycin-Gruppe dagegen ist die Schlafzeit als Folge der Induktion des ganzen Metabolisierungssystems signifikant vermindert.

	n	Medikation pro kg Körpergew.	Beh. Dauer n-Tage	Evipan- Schlaf- zeit/min	% Verände- rungen ▲ %
Kontrolle	5			53,2	
Phenobarbital sc.	5	2 x 50 mg	3	22,2	- 58
Actinomycin i.p.	5	500 γ	2	147,2	+ 177
Phenobarb. s.c. + Actino- mycin i.p.	5	2 x 50 mg + 500 γ	3 2	35,2	- 34

Tab. 6

Durchführung des Evipan-Schlaftests (150 mg/kg) 16 Stunden nach der letzten Phenobarbital- und 48 Stunden nach der letzten Actinomycin-Applikation.

▲ % gibt die Verkürzung (-) bzw. die Verlängerung (+) der Evipan-Schlafzeit an.

b) Beeinflussung der Induktion cytoplasmatischer und mitochondrialer Enzyme durch Actinomycin.

Die vorstehend beschriebenen Versuche haben gezeigt, daß unter den von uns gewählten Bedingungen die Induktion der mikrosomalen Metabolisierungsenzyme durch Actinomycin fast vollständig unterbunden wird.

Wir prüften deshalb in der gleichen Versuchsanordnung, ob auch der Anstieg extramikrosomaler Enzyme und die darauf beruhende Lebervergrößerung durch Actinomycin hemmbar ist, also ebenfalls über kernregulierte Schritte verläuft.

Da die Zunahme der cytoplasmatischen und mitochondrialen Enzyme langsamer erfolgt und quantitativ wesentlich geringer ist als die der mikrosomalen Enzyme (Tab. 1 und 2), war hier eine sehr starke Induktion notwendig.

Voruntersuchungen von HERBOLD (1969) und MIEHE (1967) hatten gezeigt, daß der Anstieg des Lebergewichts und der extramikrosomalen Enzyme nach peroraler Phenobarbital-Zufuhr wesentlich stärker ist als nach intraperitonealer oder subcutaner Applikation. Wir applizierten deshalb in einem ersten Versuch Phenobarbital in einer Konzentration von 150 mg pro kg Tiergewicht täglich als 0,1 %ige Lösung im Trinkwasser.

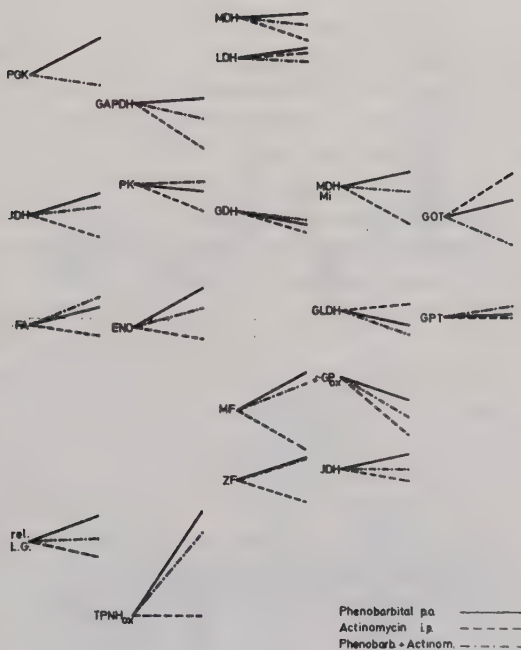


Abb. 2:

Beeinflussung von Lebervergrößerung und Enzyminduktion nach 3-tägiger peroraler Applikation von 150 mg Phenobarbital pro kg Körpergewicht (KG) durch 500 μ /kg Actinomycin i.p. täglich. Angabe der Enzymgehalte der Gesamtleber bezogen auf 25 g Tiergewicht. Aufzeichnung der Enzymaktivitäten im logarithmischen Maßstab.

Ausgangspunkt der den Verlauf der Enzymveränderungen darstellenden Geraden sind die jeweiligen Enzymgehalte unbehandelten Kontrolltiere.

Die Endpunkte geben die real gemessenen Enzymgehalte der verschiedenen Gruppen bei Versuchsende an.

Angabe des relativen Lebergewichts in mg pro g. Tiergewicht.

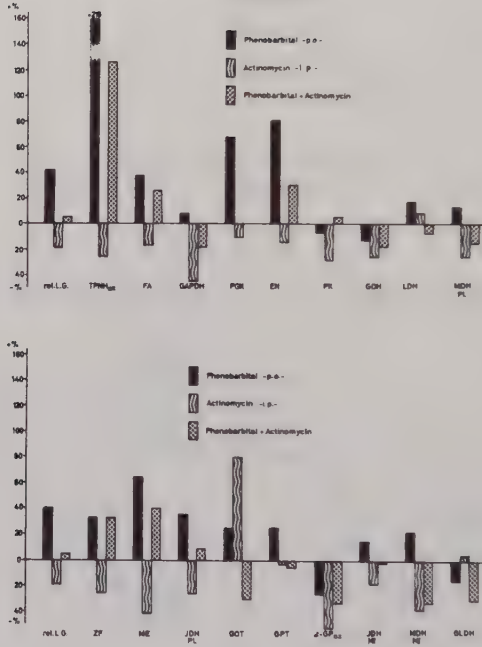


Abb. 3:

Versuchsbedingungen wie unter Abb. 2.
 Prozentuale Veränderungen der in Abb. 2 dargestellten
 Gesamt-Enzymgehalte bezogen auf die Werte unbehandelter
 Kontrolltiere.

1. Wirkung von Actinomycin bei peroraler Phenobarbital-Applikation.

Die Resultate dieser Versuche sind in Abb. 2 dargestellt. Zur besseren Vergleichbarkeit gibt Abb. 3 die prozentualen Veränderungen wieder. Die diesen Werten zugrunde liegenden absoluten Enzymaktivitäten finden sich im Anhang (Tab. I). Der Anstieg von relativem Lebergewicht und dem größten Teil der Enzymgehalte wird durch Actinomycin stark gehemmt. So finden wir bei der kombiniert mit Phenobarbital und Actinomycin behandelten Gruppe relatives Lebergewicht und Enzymaktivitäten deutlich erniedrigt gegenüber den mit Phenobarbital induzierten Tieren, jedoch noch leicht erhöht gegenüber der Kontrollgruppe.

Abweichend verhalten sich nur die Transaminasen, vor allem die GOT und die GLDH; sie werden durch Actinomycin nicht gehemmt, sondern zum Teil signifikant erhöht. Es handelt sich dabei sicher nicht um eine relative Konzentrationszunahme, die auf der Verminderung der anderen Enzyme und des Lebergewichts beruht. Die Darstellung der Leber-Gesamtgehalte zeigt, daß hier eine reale Enzymzunahme vorliegt. Dieses Phänomen wurde bereits von anderen Untersuchern (F. ROSEN et al., 1964) beschrieben; seine sichere Klärung steht noch aus. TOMKINS (1969) entwickelte aus dieser Beobachtung ein Konzept der Translationsregulation. Es wird darin postuliert, daß die Enzymsynthese auf der Translationsebene durch einen enzyspezifischen Repressor gesteuert wird; aus umfangreichen experimentellen Daten wird geschlossen, daß der Translationsrepressor der unter Actinomycin ansteigenden Enzyme durch den Hemmstoff besonders leicht inhibiert wird.

2. Wirkung von Actinomycin bei intraperitonealer Phenobarbital-Applikation.

Bei der peroralen Phenobarbital-Zufuhr der ersten Versuchsreihe wurden von allen Kollektiven annähernd gleiche Trinkmengen und damit gleiche Phenobarbital-Dosen aufgenommen. Es muß jedoch daran gedacht werden, daß in den mit Actinomycin behandelten Gruppen durch die Schädigung des Darmepithels sowie die beschleunigte Darmpassage (Diarrhoen) veränderte Resorptionsverhältnisse für Phenobarbital vorliegen und daß die verminderte Induktion damit teilweise auf einer verringerten Substanzaufnahme beruhen könnte. Wir schlossen deshalb trotz der geringeren Wirksamkeit eine Versuchsreihe an, in der 100 mg Phenobarbital täglich intraperitoneal gleichzeitig mit Actinomycin injiziert wurde. Wegen des niedrigen Induktionsausmaßes bei intraperitonealer Phenobarbital-Applikation war die Beurteilung der Enzymveränderungen erschwert. Grundsätzlich fanden wir dieselben Veränderungen wie nach peroraler Phenobarbital-Verabreichung. Die Absolutwerte sind in Abb. 4 und in Anhangs-Tabelle II aufgeführt, in Abb. 5 finden sich die prozentualen Veränderungen.

3. Wirkung von Actinomycin bei subcutaner Phenobarbital-Applikation.

Wegen der relativ geringen Induktionsstärke bei intraperitonealer Phenobarbital-Zufuhr versuchten wir in einer dritten Versuchsreihe eine deutlichere Wirkung durch subcutane Injektion von 50 mg/kg Tiergewicht 2 x täglich an 4 Tagen zu erzielen. Die Resultate sind in Anhangstabelle III aufgeführt; Abb. 6 und 7 geben die wesentlichen Wirkungen wieder. Lebervergrößerung und Enzyminduktion entsprachen quantitativ und qualitativ den bei intraperitonealer Applikation erhaltenen Ergebnissen. Eine verstärkte Induktionswirkung konnte durch die protrahierte Einwirkung des



Abb. 4:

Beeinflussung von Lebervergrößerung und Enzyminduktion
nach 4-tägiger Zufuhr von 100 mg/kg Phenobarbital i.p.
durch 4-tägige Applikation von 500 γ /kg Actinomycin i.p.

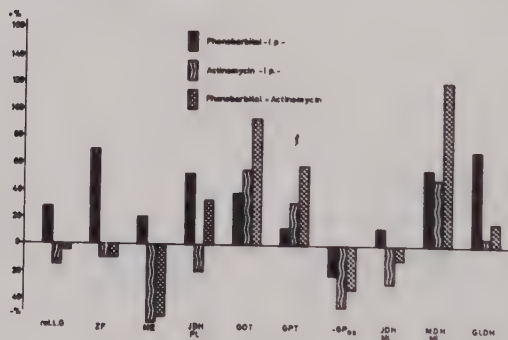
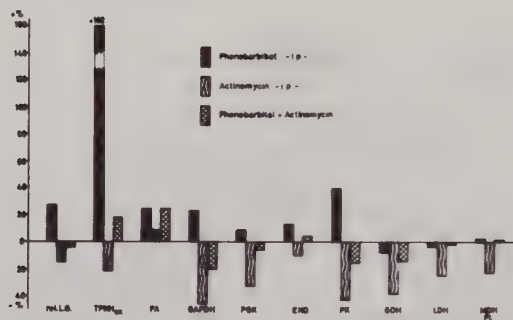


Abb. 5:

Prozentuale Veränderungen der Enzymgehalte nach i.p.

Phenobarbital-Zufuhr (100 mg/kg/die)

Mengenangabe von Actinomycin wie unter Abb. 4, Darstellung wie unter Abb. 3.

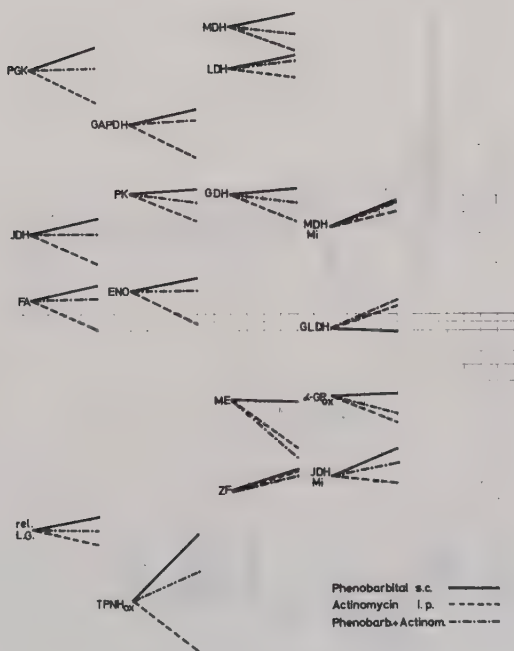


Abb. 6:

Beeinflussung von Lebervergrößerung und Enzyminduktion nach 4-tägiger subcutaner (s.c.) Injektion von 2 x 50 mg/kg KG Phenobarbital täglich durch 500 γ/kg Actinomycin i.p. Darstellung wie unter Abb. 2

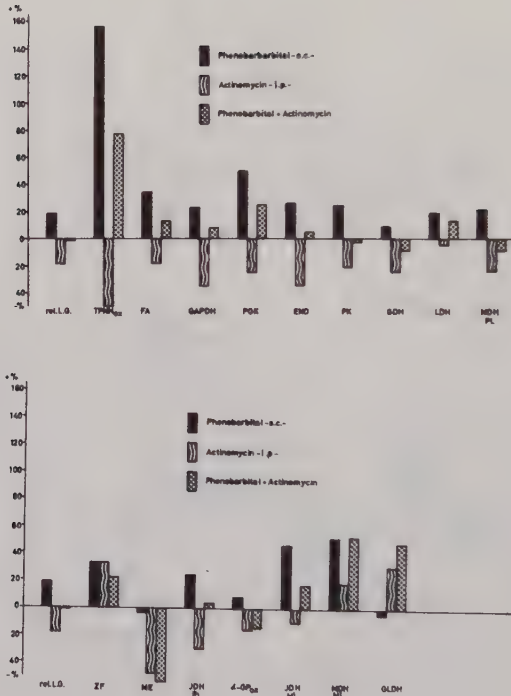


Abb. 7:

Prozentuale Veränderungen der Enzymgehalte nach s.c. Phenobarbital-Zufuhr (2 x 50 mg/kg KG tgl.) durch Applikation von 500 γ /kg Actinomycin i.p. täglich. Darstellung wie unter Abb. 3

Induktors bei subcutaner Applikation demnach nicht erzielt werden.

Auch die Beeinflussung von Lebervergrößerung und Enzymvermehrung wird durch Actinomycin in vollkommen identischer Weise beeinflusst wie sie bei den vorausgegangenen beiden Serien gefunden worden war.

2. Beeinflussung der Phenobarbitalwirkung durch Hemmung der Translation.

a) Wirkung von Actidion (= Cycloheximid)

Actidion ist ein Antibiotikum aus *Streptomyces griseus*, das im Warmblütler und in Hefezellen die Proteinsynthese hemmt, ohne die RNS - und die DNS-Synthese wesentlich zu beeinflussen. (KERRIDGE 1958, YOUNG et al. 1964, BENNETT et al. 1964).

Als Wirkungsmechanismus wird eine Hemmung des Aminosäure-Transfers von der t-RNS bei der Synthese der Polypeptidkette an der RNS-Matrize angenommen (ENNIS et al. 1964). Die Ablösung der neusynthetisierten Polypeptidkette wird dagegen nicht beeinflusst. Diese Ansicht ist jedoch nicht unwidersprochen geblieben. In neueren Arbeiten (HILF et al. 1967) wurde auch eine Hemmung der RNS-Synthese zumindest innerhalb eines bestimmten Dosisbereiches gefunden. Die durch Oestrogen induzierte Steigerung der Incorporation von Uridin in RNS wurde durch Actidion gehemmt und ebenso wurde die Incorporation von P_{32} in Thymus-RNS vermindert (YOUNG et al. 1963). Es ist jedoch denkbar, daß die Hemmung der RNS-Synthese hier sekundär ist und eine Folge der primären Syntheschemmung von Enzymen der RNS-Bildung darstellt. Von anderen Autoren wurde eine Hemmung der Ribosomen-Aggregation beobachtet und als Ursache der Actidion-Wirkung angesehen.

Unsere Untersuchungen, ob die Enzyminduktion nach Phenobarbitaleinwirkung durch Cycloheximid hemmbar ist, erwiesen sich methodisch als außerordentlich schwierig.

Zur Hemmung durch Oestrogene induzierter Enzymsynthesen wurden von HILF et al. (1967) Dosen von 1 mg/kg benötigt. Es wird darauf hingewiesen, daß Enzymsynthesen in Leber

und Niere dabei unbeeinflusst bleiben. Wir fanden bei Anwendung von 50 mg/kg ebenfalls noch keine Hemmung. Eine sichere Wirkung wurde erst bei einer extrem hohen Dosierung von 100 mg/kg erhalten.

Bei alleiniger Applikation wurde diese Dosis während des Beobachtungszeitraumes von 4 Tagen toleriert. Bei der kombinierten Behandlung mit Phenobarbital und Cycloheximid dagegen waren die Tiere bei Anwendung der induzierenden Luminal-Dosis von 100 mg/kg schon nach der ersten Applikation stark sediert und fielen bei weiterer Phenobarbital-Zufuhr in einen Dauerschlaf. Durch die verminderte Nahrungs- und Flüssigkeitsaufnahme verschlechterte sich dabei der Allgemeinzustand zunehmend, so daß mehr als die Hälfte der Versuchstiere ad exitum kamen. Um die stark narkotische Wirkung zu vermeiden, war notwendig, die Phenobarbital-Gesamtdosis auf zwei Einzelgaben verteilt morgens und abends zu verabreichen.

α) Beeinflussung der Induktion mikrosomaler Enzyme durch Actidion.

Untersuchungen über die Wirkung von Actidion auf die Induktion der mikrosomalen Metabolisierungsenzyme liegen bisher nicht vor. Die oben erwähnte Verstärkung der narkotischen Phenobarbitalwirkung durch Cycloheximid deutete auf eine Herabsetzung des Phenobarbitalabbaues durch diesen Inhibitor der Proteinsynthese hin.

Die Ergebnisse daraufhin durchgeführter Bestimmungen der Evipan-Schlafzeit, die ja allein von der Intensität des Evipan-Abbaus in der Leber abhängt, stützen diese Annahme. Nach 3-tägiger Vorbehandlung mit 100 mg/kg tgl. Actidion war die Schlafzeit deutlich um 41 % verlängert (Tab. 7). Die unter Phenobarbitalbehandlung auftretende starke Schlafzeitverkürzung von 60 % wurde durch Applikation der höchsten Actidiondosis (100 mg/kg) zwar nicht aufgehoben, jedoch um fast die Hälfte vermindert.

	n	Medikation mg/kg/die	Evipan Schlafzeit min	Δ %	Behandl. dauer/ Tage
Kontrollgruppe	17		67,2	-	
Phenobarbital	21	100	27,3	- 59,4	3
Actidion i.p.	16	100	94,8	+ 41,0	3

Tab. 7:

Durchführung der Evipan-Schlaftests (150 mg/kg) nach Gaben an 3 aufeinanderfolgenden Tagen von 100 mg Phenobarbital und 100 mg Actidion/kg tägl.

Δ % gibt die Verkürzung (-) bzw. die Verlängerung (+) der Evipan-Schlafzeit an.

Es war naheliegend, die Verlängerung der narkotischen Barbituratwirkung und die Herabsetzung der Phenobarbital-induktion auf eine Hemmung der Enzymsynthese durch den Inhibitor zurückzuführen. Die quantitative Analyse der mikrosomalen Enzyme, deren Ergebnisse in Tab. 8 zusammengestellt sind, erbrachten jedoch keine Bestätigung der Annahme.

Bei Applikation der hohen Actidiondosis (100 mg/kg) waren die Aktivitäten der TPNH-Oxidase und die Cytochrom-P₄₅₀-Gehalte nur gering erniedrigt. Bei Gaben von 50 mg/kg Actidion waren Enzym- und Cytochromgehalte erhöht. Der durch Phenobarbital induzierte Anstieg aller Komponenten des mikrosomalen Enzymsystems wurde auch durch die höchst tolerierte Actidiondosis von 100 mg/kg nicht unterbunden, sondern überraschend gesteigert.

Bei allen mit Actidion behandelten Tierkollektiven kann demnach die erhebliche Verstärkung der narkotischen

Barbituratwirkung nicht auf eine verminderte Synthese der fremdstoffabbauenden Enzyme zurückgeführt werden.

Als Ursache der hier offensichtlich bestehenden Divergenz von Enzymgehalten und Enzymfunktion sind zwei Möglichkeiten zu diskutieren:

Einmal ist denkbar, daß Cycloheximid durch Hemmung anderer Stoffwechselketten die Aktivität der Mikrosomenenzyme limitiert. Das wäre vor allem möglich durch eine Verminderung der TPNH-regenerierenden Enzyme wie G_6 -PDH, IDH und ME, deren Synthese nach HILF et al. (1967) in Uterus und Brustdrüsengewebe durch Actidion besonders stark inhibiert wird. Als wahrscheinlichere Erklärung ist jedoch anzunehmen, daß Cycloheximid mit dem Barbituratabbau durch Bindung an die Substratreceptoren der mikrosomalen Metabolisierungsenzyme interferiert. Das ist aus der chemischen Konfiguration der Substanz zu vermuten. Experimentell spricht dafür der Befund, daß der Evipanabbau selbst in der durch Phenobarbitalvorbehandlung maximal induzierten Leber unmittelbar nach Zufuhr einer einmaligen Actidiongabe schon gehemmt ist, obwohl mikrosomale Enzym- und Cytochromgehalte zu diesem Zeitpunkt nicht verändert sind. Auch der überraschende Befund, daß bei Einwirkung kleiner Cycloheximid-dosen (Tab. 8) und bei kombinierter Anwendung von Phenobarbital und Actidion die Gehalte aller mikrosomalen Enzyme teilweise stark ansteigen, kann möglicherweise auf eine Reaktion der Substanz mit den Substratbindungsstellen zurückgeführt werden. Eine analoge Induktion der mikrosomalen Enzyme durch enzymgebundene Hemmstoffe ist für SKF 525 A und Metyrapon nachgewiesen worden. Auf andere Interpretationsmöglichkeiten wird später eingegangen werden.

Tab. 8 a					TPNH-ox		Cytochrom P-450		Cytochrom b 5	
	Dosis mg/die	Dauer Tage	rel L G	$\Delta\%$	IE/gL	$\Delta\%$	$\frac{\mu\text{Mol}}{\text{gL}}$	$\Delta\%$	$\frac{\mu\text{Mol}}{\text{gL}}$	$\Delta\%$
Kontr			46,8	0	0,13 +0,01	+100	6,03 +0,6	0	2,16 +0,36	0
Pheno	2x50	3	60,0	+28,3	0,26	+100	15,3	+237	4,5	+171
Actid	100	4	51,5	+10,2	0,11	-15,4	4,9	-11,7	2,3	+14,8
Actid	50	4	51,6	+10,2	0,15	+15,4	10,0	+79,6	3,1	+50,9
Actid +Phen	100 2x50	4 3	62,5	+33,7	0,51	+284	25,0	+450	5,9	+265
Actid +Phen	50 2x50	4 3	52,9	+13,2	0,26	+100	15,3	+179	4,3	+119

Tab. 8 b					TPNH-ox		Cytochrom P-450		Cytochrom b 5	
	Dosis mg/die	Dauer Tage	rel L G	$\Delta\%$	IE/gL	$\Delta\%$	$\frac{\mu\text{Mol}}{\text{gL}}$	$\Delta\%$	$\frac{\mu\text{Mol}}{\text{gL}}$	$\Delta\%$
Kontr					0,17 +0,16	0	6,03 +0,95	0	2,63 +0,5	0
Pheno	2x50	3			0,42	+147	24,44	+238	4,5	+108
Actid	100	4			0,14	-17,6	6,39	-11,7	7,1	+8,0
Actid	50	4			0,20	+17,6	13,0	+79,6	3,9	+41,6
Actid +Phen	100 2x50	4 3			0,80	+370	39,9	+450	9,5	+177
Actid +Phen	50 2x50	4 3			0,34	+100	20,2	+179	5,7	+119

Tab. 8 (a u. b)

Beeinflussung des Anstiegs mikrosomaler Enzyme nach Phenobarbital-Induktion durch Actidion.

Phenobarbital wurde in 2 Einzelgaben von je 50 mg/kg KG subcutan (s.c.), Actidion in den Konzentrationen von 50 mg/kg und 100 mg/kg KG intraperitoneal (i.p.) verabreicht. Durchführung der Untersuchungen 24 Stunden nach der letzten Phenobarbitalgabe.

a) Enzymkonzentrationen pro g Leber

b) Enzymgesamtgehalte der Leber eines 25g schweren Tieres

B) Beeinflussung der Induktion cytoplasmatischer und mitochondrialer Enzyme durch Actidion.

Eine Aktivitätsbeeinflussung cytoplasmatischer und mitochondrialer Enzyme konnte wegen der schwachen Wirkung von Cycloheximid auf die Leber nur durch Gaben hoher Actidiondosen (100 mg/kg) erzielt werden. Es fand sich dabei eine qualitativ ähnliche, jedoch quantitativ wesentlich schwächere Wirkung als sie von HILF et al. (1967) in Uterus- und Brustdrüsengewebe gefunden wurde. Wir konnten in unseren Enzymanalysen deutliche Aktivitätsabnahmen der TPN-abhängigen Enzyme (ME, ZF, IDH plasm.) feststellen; weniger ausgeprägte, aber doch noch recht deutliche Abnahmen fanden sich bei den Enzymen der Embden-Meyerhof-Kette (GAPDH, PK). Die großen Enzyme (LDH, GDH, MDH) zeigten nur eine ganz geringe Aktivitätsverminderung (Abb. 8 und 9). Wie bei den mikrosomalen Enzymen bestehen auch hier offensichtliche Zusammenhänge mit der Umsatzgeschwindigkeit der Enzyme. Es ist verständlich, daß durch Synthesehemmung die Gehalte derjenigen Enzyme am stärksten absinken, die den größten turnover und damit die geringste Halbwertszeit besitzen.

Abweichend von dieser umfangreichen Gruppe der mehr oder weniger stark gehemmten Enzyme verhielten sich auch hier die Enzyme des Aminosäurestoffwechsels (GOT, GPT, GLDH), deren Aktivität wie unter der Actinomycineinwirkung anstieg. Da die relativen Lebergewichte unter der Actidion-einwirkung nur gering verändert waren, beruhte auch hier der Aktivitätsanstieg dieser Enzymgruppe nicht auf einer relativen, durch das Absinken der übrigen Enzyme vorge-täuschten Zunahme, sondern sicher auf einer absoluten Vermehrung der Gesamtenzymgehalte.

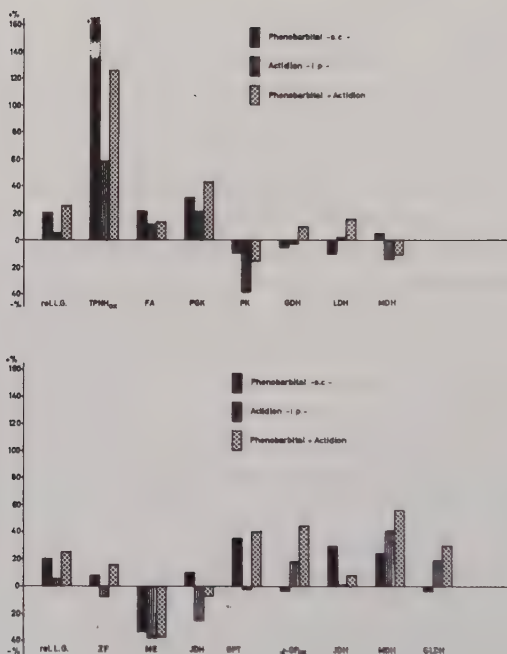


Abb. 8:

Beeinflussung von Lebervergrößerung und Enzyminduktion nach viertägiger subcutaner Applikation von 2 x 50 mg Phenobarbital /kg KG/die durch 100 mg/kg KG Actidion i.p. täglich.

Dargestellt sind die prozentualen Veränderungen des relativen Lebergewichtes und der Gesamt-Enzymgehalte bezogen auf die Werte unbehandelter Kontrolltiere.

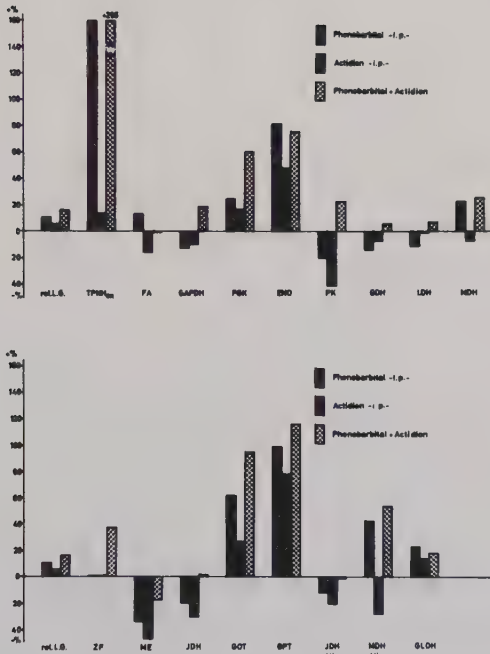


Abb. 9:

Beeinflussung von Lebervergrößerung und Enzyminduktion nach dreitägiger intraperitonealer Applikation von 100 mg Phenobarbital/kg KG/tägl. durch 100 mg Actidion i.p. täglich.
Darstellung wie unter Abb. 8.

Da Cycloheximid die Enzymsynthese auf der Translations-ebene hemmt, kann der Anstieg der Transaminasen hier nicht wie bei Actinomycin mit dem von TOMKINS postulierten Regulationsprinzip erklärt werden. Auf diese Frage wird in der Diskussion eingegangen werden.

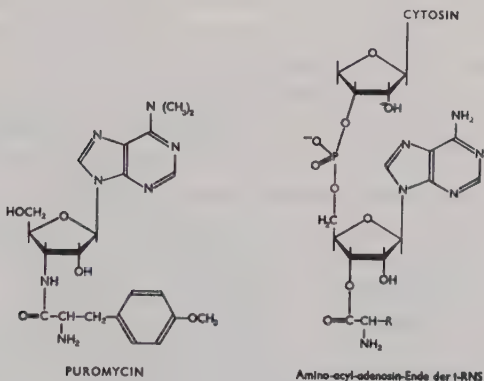
Die Wirkung von Actidion auf den durch Phenobarbital bedingten Gehaltanstieg des relativen Lebergewichts und der extramikrosomalen Enzyme wurde wegen der einleitend erwähnten Schwierigkeiten überwiegend bei Tieren geprüft, bei denen die halbe Phenobarbitaldosis 2-mal täglich subcutan appliziert worden war. Nur bei einem kleinen Kollektiv wurde hier die Wirkung bei intraperitonealer und peroraler Phenobarbital-Zufuhr untersucht. Unabhängig von der Applikationsart wurden dabei qualitativ übereinstimmende Wirkungen erzielt.

In den beiden Versuchsreihen (Abb. 8 und 9), in denen Phenobarbital und Actidion kombiniert während eines Zeitraumes von 4 Tagen appliziert worden waren, wurden der durch Phenobarbital induzierte Enzymanstieg und die Vermehrung des relativen Lebergewichtes durch Actidion nur gering beeinflußt. Das Absinken der durch Cycloheximid stark hemmbaren Enzyme (IDH, GDH) wird durch kombinierte Applikation mit Phenobarbital unter diesen Versuchsbedingungen verhindert. Die Wirkung von Actidion wird demnach durch Phenobarbital herabgesetzt.

Diese Ergebnisse lassen annehmen, daß der Hemmstoff nicht nur an die mikrosomalen Metabolisierungsenzyme gebunden ist, sondern durch sie auch inaktiviert wird. Bei durch Phenobarbital induzierten Tieren wurden durch verstärkten Abbau deshalb möglicherweise keine ausreichenden Hemmspiegel aufrecht erhalten.

b) Wirkung von Puromycin.

Puromycin hemmt die Proteinsynthese in Procaryonten und Säugetierzellen ebenfalls auf der Ebene der Translation. In seiner Struktur gleicht es dem 3'-terminalen Ende von Aminoacyl-t-RNS (s. Formel).



Aus dieser Strukturähnlichkeit ergibt sich sein Wirkungsmechanismus (Yarmonlinsky et al. 1959):

Im Verlauf der Proteinsynthese wird die Peptidkette von einem Molekül t-RNS an das nächste weitergegeben, wobei sie jedesmal um eine Aminosäure verlängert wird. Durch Einwirkung von Puromycin wird aber die Kette anstatt an die nächste Aminoacyl-t-RNS an die freie Aminogruppe von Puromycin angehängt. Dadurch wird der Polymerisationsprozeß unterbrochen und die unfertige Peptidkette mit einem Molekül Puromycin am Carboxylende löst sich vom Ribosom ab.

In Untersuchungen von CONNEY et al. (1963) wurde eine Hemmung der durch Pharmaka bedingten Mikrosomeninduktion

durch Puromycin nachgewiesen. Er schloß daraus, daß die Vermehrung der mikrosomalen Enzyme auf einer Steigerung ihrer Biosynthese beruhe.

In unseren Versuchen fanden wir eine nur angedeutete Hemmung des durch Phenobarbital induzierten Anstiegs der TPNH-Oxidase; bei alleiniger Einwirkung von Puromycin stieg die Aktivität der mikrosomalen TPNH-Oxidase sogar deutlich über die der Kontrollgruppe an (Abb. 10 und 11). Damit übereinstimmend war auch das relative Lebergewicht der mit Puromycin behandelten Tiere in keinem Fall erniedrigt, sondern lag gering über dem der entsprechenden Vergleichsgruppen. Wir führen diese nur geringe Wirkung des Puromycins darauf zurück, daß wir bei unseren mehrtägigen Versuchsanordnungen erheblich geringer dosieren mußten als CONNEY (1963) bei seinem Kurzzeitversuch. Wir applizierten 10 mg/kg täglich i.p., während CONNEY die gleiche Dosis stündlich über einen halben Tag gab. Trotz der Unwirksamkeit auf die Synthese der mikrosomalen Enzyme unter der geringen Puromycin-Dosierung fanden wir teilweise sehr ausgeprägte Hemmungen cytoplasmatischer und mitochondrialer Enzymaktivitäten. Besonders waren FA, ZF, ME und PK gehemmt, also diejenigen Enzyme, die auch unter der Actidioneinwirkung besonders ausgeprägt gehemmt wurden.

Ebenso wie bei Actidion wurde der durch Phenobarbital bedingte Anstieg der Enzymgehalte durch Puromycin nicht vermindert.

Die Aktivitäten der Enzyme des Aminosäurestoffwechsels war auch hier wie bei Actinomycin und Actidion erhöht.

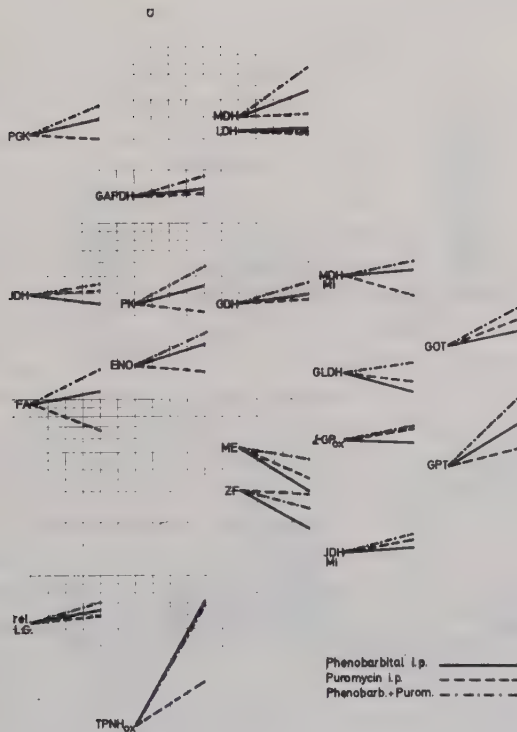


Abb. 10:

Beeinflussung von Lebervergrößerung und Enzyminduktion nach 3-tägiger intraperitonealer Applikation von 100 mg Phenobarbital/kg KG tägl. durch 10 mg Puromycin/kg KG täglich i.p.

Angabe der Enzymgehalte der Gesamtleber bezogen auf 25 g Tiergewicht. Aufzeichnung der Enzymaktivitäten im logarithmischen Maßstab.

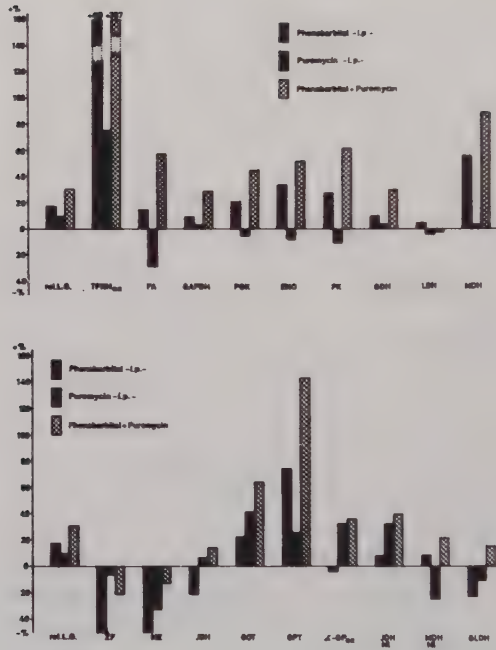


Abb. 11:

Darstellung der prozentualen Veränderungen der in Abb. 10 dargestellten Gesamt-Enzymgehalte bezogen auf die Werte unbehandelter Kontrolltiere.

Versuchsbedingungen wie unter Abb. 10.

c) Wirkung von Chloramphenicol

Chloramphenicol hemmt bei Bakterien die Proteinsynthese vollständig. Eine Wirksamkeit bei Warmblütlerzellen wurde von einigen Autoren (NATHAN et al. 1962) bei Anwendung von hohen Dosen beschrieben.

Die Hemmung der Proteinsynthese findet ebenfalls auf der Ebene der Translation statt. Chloramphenicol greift an der 50-A-Untereinheit des Ribosoms an und verhindert die Ablösung der fertigen Polypeptidkette. Es scheinen jedoch noch weitere Angriffspunkte auf anderen Regulationsebenen vorzuliegen. Bei *Escherichia coli* wird die Bildung der induzierbaren Enzyme wesentlich stärker gehemmt als die allgemeine Proteinsynthese. Es wird angenommen, daß das Antibiotikum hier in die genetische Regulation dieser induzierbaren Enzyme eingreift.

Bei Untersuchungen mit Stämmen, die eine Mutation im Regulator-Gen besitzen (i-Mutanten), wurde gefunden, daß Chloramphenicol zwar die Proteinsynthese hemmt, daß aber die adaptiven Enzyme β -Galactosidase und Tryptophan-Synthetase nicht reprimiert werden (SYPHERD et al. 1963). Es wird daraus geschlossen, daß Chloramphenicol die Synthese dieser adaptiven Enzyme über die Bildung eines Repressors auf der Transcriptionsebene hemmt.

Bei einem weiteren adaptiven Enzym in *Elcoli.*, der Ornithin-Transcarbamylase, deren Synthese durch Chloramphenicol ebenfalls stark gehemmt wird, konnten BOWNE et al. (1963) einen Repressor nachweisen, der wahrscheinlich ein Polyribonucleotid darstellt. Dieses Ergebnis ist von erheblicher Bedeutung, weil bisher noch jeder Hinweis auf die Natur des von JACOB und MONOD (1961) postulierten Repressors fehlt.

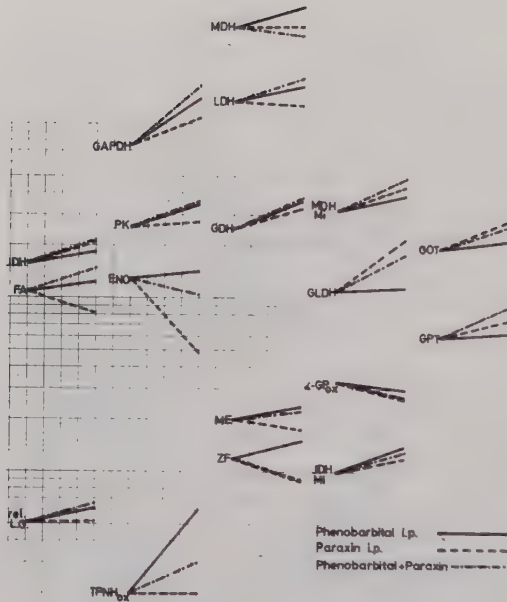


Abb. 12:

Beeinflussung von Lebervergrößerung und Enzyminduktion nach 4-tägiger intraperitonealer Applikation von 100 mg Phenobarbital durch 500 mg Paraxin/kg KG täglich i.p.

Angabe der Enzymgehalte der Gesamtleber bezogen auf 25 g Tiergewicht. Aufzeichnung der Enzymaktivitäten im logarithmischen Maßstab.

Wir fanden bei unseren Untersuchungen mit Chloramphenicol (= Paraxin^R-Hemisuccinat) auch bei Anwendung höchster Dosen (500 mg/kg) nur geringe Wirkungen auf Lebergröße und Enzymgehalte.

Gehemmt erschienen allein die Aktivitäten von G₆-PDH und ME (s. Abb. 12). Der durch Phenobarbital induzierte Anstieg von relativem Lebergewicht und Enzymgehalten wurde nicht beeinflusst; lediglich einige Enzyme (PGK, IDH, MDH, GDH) schienen gering, aber nicht signifikant gehemmt zu sein.

I. SCHMIDT et al. (1968) führten die Lebervergrößerung auf eine Hyperplasie der Leber zurück. Bei Richtigkeit dieser Vorstellung wäre von Mitomycin C eine vollständige Hemmung der durch Phenobarbital bedingten Lebervergrößerung und der damit verbundenen Enzymsynthesen zu erwarten. Die Prüfung dieser Substanz war deshalb von besonderem Interesse.

Wir applizierten unseren Versuchstieren 4 Tage lang eine 0,1 %ige Mitomycinlösung (10 mg/kg) intraperitoneal, eine Dosierung, die bei Versuchen über die Beeinflussung experimentell erzeugter Transplantations-tumoren sicher cytostatisch wirkt.

Unter dieser Behandlung kamen die beiden mit Mitomycin behandelten Gruppen in einen stark reduzierten Allgemeinzustand. Am Versuchstag war das Körpergewicht der nur mit Mitomycin behandelten Tiere stark erniedrigt, das relative Lebergewicht lag um 25 % unter dem der Kontrollgruppe. Die kombiniert mit Phenobarbital und Mitomycin behandelten Tiere hatten im Vergleich mit der unbehandelten Kontrollgruppe ein um 20 % erhöhtes relatives Lebergewicht, blieben jedoch hinter dem Gewichtsanstieg der Phenobarbitalgruppe zurück (Abb.13 und 14).

Entsprechend der beträchtlichen Lebergewichtsabnahme sanken bei den nur mit Mitomycin behandelten Tieren mikrosomale, cytoplasmatische und mitochondriale Enzymgehalte meist sehr stark ab. Abweichend verhielten sich auch hier wieder die Enzyme des Aminosäurestoffwechsels (GOT, GPT, GLDH). Bei der kombinierten Anwendung von Phenobarbital und Mitomycin kam es bei den meisten Enzymen der verschiedenen Zellräume etwa dem Verhalten des relativen Lebergewichtes entsprechend zu einem sicheren Anstieg der Enzymaktivitäten im Vergleich mit den unbehandelten Kontrollen. Gegenüber der nur mit Phenobarbital induzierten Gruppe blieb der Enzymanstieg jedoch zurück.



Abb. 13:

Beeinflussung von Lebervergrößerung und Enzyminduktion nach 4-tägiger subcutaner Applikation von 2 x 50 mg Phenobarbital/kg KG tägl. durch 10 mg Mitomycin/kg tägl. intraperitoneal. Angabe der Enzymgehalte der Gesamtleber bezogen auf 25 g Tiergewicht. Aufzeichnungen der Enzymaktivitäten im logarithmischen Maßstab.

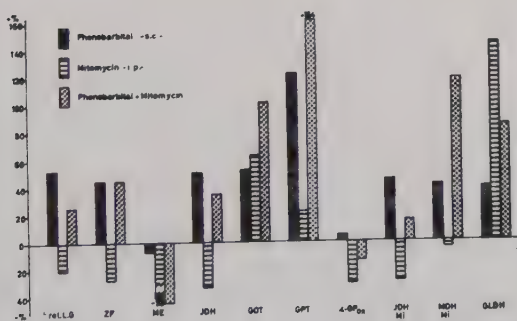
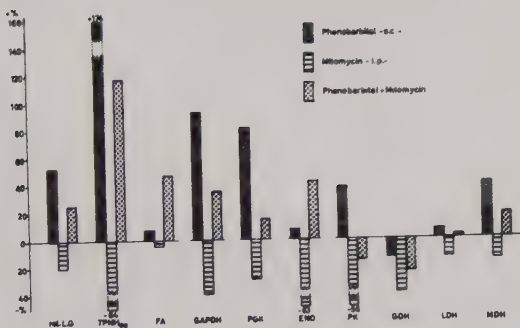


Abb. 14:

Prozentuale Veränderungen der in Abb. 13 dargestellten Gesamt-Enzymgehalte bezogen auf die Werte unbehandelter Kontrolltiere.
Versuchsbedingungen wie unter Abb. 13

Wie bei allen anderen Hemmstoffen wurde der schon durch Mitomycin allein induzierte Gehaltsanstieg der Transaminasen durch die kombinierte Behandlung mit Phenobarbital noch weiter verstärkt.

D. Diskussion

Die vorliegenden Untersuchungen sollten durch Anwendung von Hemmstoffen der DNS-, RNS- und Proteinsynthese Hinweise erbringen, nach welchen der einleitend diskutierten Prinzipien die nach Einwirkung mikrosomeninduzierender Pharmaka auftretende Gehaltszunahme mitochondrialer und cytoplasmatischer Enzyme und die darauf beruhende Lebervergrößerung erfolgt.

Während die initiale, bereits nach 1 Tag zu erhöhten Gehalten führende Induktion der mikrosomalen Metabolisierungsenzyme durch Anwendung von Syntheseinhibitoren gut analysiert werden kann (CONNEY et al., 1963), war es sehr schwierig, den erst nach 3 Tagen zu sicher erhöhten Werten führenden Gehaltsanstieg der extramikrosomalen Enzyme in gleicher Weise zu beurteilen.

Eine vollständige Hemmung der Leberenzym-synthese führte während dieses Zeitraumes zu einer schweren Beeinträchtigung des Allgemeinzustandes der Versuchstiere und damit zur Abnahme von Körper- und Lebergewicht. Es war deshalb nicht möglich, den für eine vollständige Hemmung erforderlichen Spiegel während der ganzen Versuchsreihe aufrecht zu erhalten.

Durch Variation der Dosis, der Applikationsart und der Applikationsfrequenz konnten trotz dieser Schwierigkeit experimentelle Bedingungen erhalten werden, die aus dem Vergleich der Hemmungsintensität Rückschlüsse auf die Wirkungsmechanismen der Induktion extramikrosomaler Enzyme durch Phenobarbital zuließen.

Die detaillierten Ergebnisse der verschiedenen Versuchsreihen wurden bereits im Zusammenhang mit den experimentellen Daten besprochen.

Die für unsere Fragestellung wesentlichen Resultate aller vergleichbaren Versuchsreihen sind in Abb. 15

zusammengefaßt. Das Diagramm zeigt, daß es bei isolierter Einwirkung von Hemmstoffen der verschiedenen Regulationsebenen zu einer relativ einheitlichen Veränderung der Enzymgehalte kommt. Wie schon bei der Besprechung der einzelnen Inhibitoren erwähnt, findet sich die stärkste Erniedrigung bei den mikrosomalen Enzymen, wobei in der Reihenfolge der Intensität P 450 stärker gehemmt ist als Cytochrom b 5 und die TPME-Oxidase. Die Gehaltsabnahme der Enzyme des Emden-Meyerhof-Weges (TIM, GAPDH, Aldolase, PK) sowie der Enzyme G_6 -PDH und ME ist weniger ausgeprägt; die "großen" Enzyme LDH und GDH werden kaum beeinflusst.

Das Ausmaß der Hemmung läßt demnach eine deutliche Beziehung zur turn-over-Rate der einzelnen Enzyme erkennen. Eine Ausnahme bei allen untersuchten Hemmstoffen bildeten die Enzyme des Aminosäure-Stoffwechsels, die GOT, GPT und GLDH. Ihre Aktivitäten stiegen nicht nur relativ - bedingt durch die Abnahme der übrigen Enzyme - sondern auch absolut an. (REEL et al., 1968). Von ROSEN et al. (1964) wurde ein analoges Verhalten auch anderer kataboler Enzyme des Aminosäure-Stoffwechsels (Alanintransaminase, Serindehydrase, Tyrosintransaminase, Tryptophanpyrrolase) nach Applikation hoher Actinomycindosen beschrieben. REEL et al. (1968) beobachteten das gleiche Phänomen bei Kulturen von Hepatomzellen und führten es auf eine Steigerung der Enzymsynthese bei vermindertem Enzymabbau zurück.

Ebenfalls aus Untersuchungen an Hepatomzellen schloß TOMKINS (1969) aus der Induzierbarkeit der Tyrosin-Transaminase durch Actinomycin auf eine Beeinflussung der Posttranskriptions-Regulation. TOMKINS postulierte, daß durch Actinomycin entweder die Synthese eines Translationsrepressors oder eines m-RNS-degradierenden Enzyms gehemmt wird. Ob der Aktivitätsanstieg der Transaminasen in unseren Versuchsreihen in gleicher Weise gedeutet werden kann, erscheint jedoch zweifelhaft. Der Anstieg

**Beeinflussung des Leberenzymanstiegs nach Phenobarbital
(100 mg/kg/die/4 Tage) durch Hemmung von**

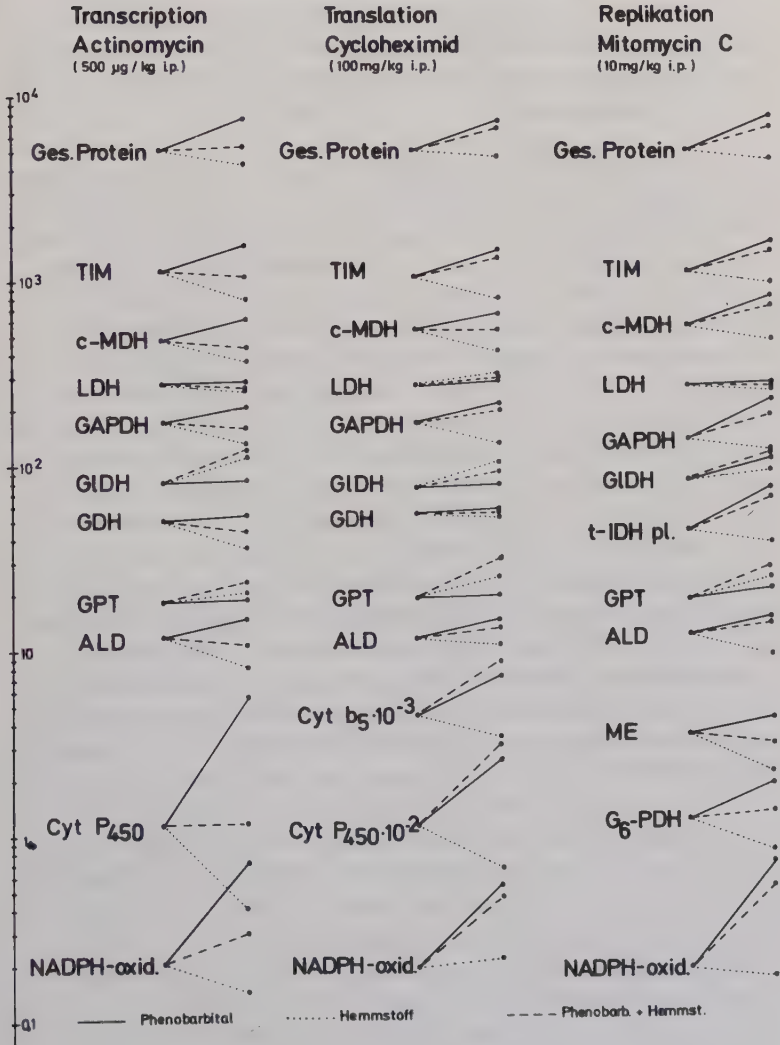


Abb. 15

dieser Enzyme auch bei Einwirkung aller Translationsinhibitoren und von Mitomycin läßt sich eher darauf zurückführen, daß durch die verminderte Nahrungsaufnahme der Versuchstiere körpereigenes Eiweiß abgebaut wird. In Untersuchungen von HERBOLD (1969) finden sich bei reiner Eiweißernährung mit Purina identische Veränderungen der Enzymmuster.

Ein Hinweis auf den Mechanismus des Enzymanstiegs unter der Einwirkung von Phenobarbital ergab sich aus dem Vergleich der Enzymverläufe unter der isolierten Einwirkung von Phenobarbital und den verschiedenen Hemmstoffen. Es ließ sich nachweisen, daß alle Enzyme (Cyt. P 450, TPNH-Oxidase, GAPDH, PK, TIM, ZF, ME), deren Gehalte durch Enzyminhibitoren stark erniedrigt werden, unter Phenobarbitaleinwirkung besonders ausgeprägt ansteigen; umgekehrt werden die wenig gehemmten Enzyme (GLD, LDH) durch Phenobarbital. Diese offensichtlich gesetzmäßige Beziehung könnte darauf beruhen, daß der Abbau der Enzyme durch Phenobarbital gehemmt wird oder daß ihre Synthese intensiviert wird. Bei Enzymen mit hoher Syntheserate müßte sich dadurch der höchste Gehaltszuwachs finden und umgekehrt bei langsam synthetisierenden Enzymen der niedrigste. Die Versuche mit kombinierter Anwendung von Phenobarbital und Hemmstoffen machen wahrscheinlich, daß der Gehaltsanstieg extramikrosomaler Enzyme durch Phenobarbitaleinwirkung auf einer Steigerung der Enzymsynthese beruht.

Durch Hemmung auf der Transkriptionsebene mit Actinomycin kann der Anstieg der durch Phenobarbital induzierbaren Enzyme vollständig unterbunden werden. Die Enzymgehalte der kombiniert behandelten Gruppe liegen zwar über denen der ausschließlich mit Actinomycin behandelten Versuchstiere, jedoch beruht dieses Phänomen mit großer Wahrscheinlichkeit darauf, daß während der Versuchsdauer von 3 Tagen keine vollständige Hemmung der

Enzymsynthese aufrecht erhalten werden konnte. Für diese Deutung spricht, daß der sicher auf Synthesesteigerung beruhende Anstieg von Cytochrom P-450, b-5 und TPNH-Oxidase sich gleich verhält.

Die bei dieser Versuchsreihe gleichzeitig durchgeführten Analysen des RNS-Stoffwechsels machten überdies wahrscheinlich, daß Phenobarbital die Wirkungsdauer von Actinomycin herabsetzt. In der kombiniert mit Phenobarbital und Actinomycin behandelten Versuchsgruppe kam es früher zu einer überschließenden m-RNS-synthese als in der ausschließlich mit Actinomycin behandelten Gruppe.

Die Hemmung der Phenobarbitalwirkung durch Inhibitoren auf der Ebene der Translation war wie im experimentellen Teil ausführlich besprochen aus methodischen Gründen weniger eindrucksvoll nachzuweisen. Eine Hemmung der Synthesesteigerung ließ sich jedoch auch hier sowohl mit Actidion wie durch sehr geringe Dosen Puro-mycin erzielen. Trotz der Schwierigkeit der Interpretation kann aus den Untersuchungen geschlossen werden, daß auch die Zunahme mitochondrialer und cytoplasmatischer Enzyme durch die Steigerung der Enzymsynthese bedingt ist und auf einer Steigerung des Transkriptionsprozesses beruht. Eine gleichzeitige Hemmung des Enzymabbaus kann aus den vorliegenden Resultaten nicht sicher ausgeschlossen werden. Es ist durchaus denkbar, daß enzyminduzierende Pharmaka über ein integriertes Regelsystem durch Synthesesteigerung und Abbauehemmung zum Anstieg der Enzymgehalte führen, wie dies für Hydrocortison und andere Hormone wahrscheinlich gemacht wurde.

E. Zusammenfassung

Aufgabe der vorliegenden Arbeit war es, durch Anwendung von Hemmstoffen der Protein-, RNS- und DNS-Synthese Hinweise auf den Mechanismus der durch Pharmaka induzierten Lebervergrößerung zu erhalten.

Dazu wurde bei männlichen NMRI-Mäusen der durch Applikation von Phenobarbital bedingte Anstieg des Lebergewichtes und die diesem zugrunde liegende Gehaltszunahme von 20 mikrosomalen, mitochondrialen und cytoplasmatischen Enzymen bestimmt. Es wurde der Anstieg der Enzymgehalte unter Phenobarbitaleinwirkung und dessen Hemmbarkeit durch Actinomycin, Actidion, Puromycin, Chloramphenicol und Mitomycin geprüft. Als Maß der Funktionsaktivität der mikrosomalen Metabolisierungsenzyme *in vivo* wurde die Abbaugeschwindigkeit von Hexobarbital durch Ermittlung der Schlafzeit bestimmt.

Folgende Ergebnisse wurden erhalten:

1. Isolierte Applikation der Hemmstoffe führt bei dreitägiger Zufuhr zu einer annähernd identischen Veränderung der Leberenzymaktivitäten. Deutliche Abnahmen der Enzymgehalte finden sich bei den mikrosomalen Enzymen (TPNH-Oxidase, Cytochrom P 450, Cytochrom b 5) und bei einigen Enzymen der Embden-Meyerhof-Kette (GAPDH, PK); die Gehalte der "großen" Enzyme (LDH, GDH) werden dagegen nur wenig beeinflusst. Es besteht eine deutliche Beziehung zur turn-over Rate der einzelnen Enzyme: die Hemmung der Enzymsynthese führt zu einer Aktivitätsabnahme entsprechend der Umsatzgeschwindigkeit der Enzyme.
Abweichend verhalten sich die Enzyme des katabolen Aminosäurestoffwechsels (GCT, GPT, GLDH) deren Enzymaktivitäten absolut ansteigen.

Als Ursache des Phänomens werden das von TOMMINS (1969) entwickelte Konzept einer Translationsregulation oder eine Induktion der katabolen Enzyme auf Grund einer verminderten Nahrungsaufnahme und des Abbaus körpereigener Eiweiße unter der Einwirkung der Hemmstoffe diskutiert. Die letztere Annahme würde den Anstieg der katabolen Enzyme auch bei Einwirkung der Translationsinhibitoren bei Hemmung der DNS-Replikation durch Mitomycin erklären.

2. Der durch Phenobarbital bedingte Anstieg cytoplasmatischer und mitochondrialer Enzyme wird in gleichem Umfang wie der Anstieg mikrosomaler Enzyme durch Hemmung auf der Ebene der Transkription mit Actinomycin herabgesetzt.
3. Unter den Translationsinhibitoren hemmen Cycloheximid (Actidion) und Puromycin vor allem cytoplasmatische und mitochondriale Enzyme (FA, ZF, ME, PK). Auch der durch Phenobarbital bedingte Anstieg dieser Enzyme wird herabgesetzt. Chloramphenicol beeinflusst den durch Phenobarbital induzierten Anstieg von Lebergewicht und Enzymgehalten nicht.
4. Mitomycin hemmt die DNS-Synthese in der Zelle selektiv auf der Ebene der Replikation. Entsprechend einer starken Lebergewichtsabnahme sind bei den nur mit Mitomycin behandelten Versuchstieren mikrosomale, cytoplasmatische und mitochondriale Enzymaktivitäten erniedrigt.
Bei der kombinierten Anwendung von Phenobarbital und Mitomycin kommt es zu einem geringen Anstieg von relativem Lebergewicht und Enzymgehalten im Vergleich mit den unbehandelten Kontrolltieren; gegenüber der nur mit Phenobarbital induzierten Gruppe bleibt der Enzymanstieg jedoch zurück.

F. Anhangstabellen

In den Tabellen sind die jeweiligen Enzymgehalte in internationalen Einheiten (IE) pro Gesamtleber einer 25 g schweren Maus (LG₂₅) angegeben.

Größenangabe bei den mit Phenobarbital und Enzymhemstoffen behandelten Tieren als prozentuale Veränderungen bezogen auf das jeweilige Kontrollkollektiv.

Angabe der statistischen Signifikanz bei Phenobarbital und isoliert mit Hemmstoffen behandelten Tieren gegenüber der Kontrollgruppe, bei der Hemmstoff-Phenobarbitalgruppe gegenüber dem Phenobarbitalkollektiv.

Die Kennzeichnung der Irrtumswahrscheinlichkeit wird durch verschiedene Anzahl von + angegeben.
(s. S. 23)

Dosierung und Behandlungsdauer siehe Text.

	Kontroll	Phenob.s.c.	Actinom.i.p.	Phenob.s.c. +Actinom.i.p.
	n=7	n=7	n=6	n=5
	IE/LG ₂₅	IE/LG ₂₅	IE/LG ₂₅	IE/LG ₂₅
	Δ%	Δ%	Δ%	Δ%
TPNHox	0,2 =100%	0,8 +++ +218,6	0,2 (+) -25,2	0,6 +125,5
FA	9,2 =100%	11,7 (+) +37,2	8,0 -16,6	13,1 +25,6
GAPDH	172,1 =100%	183,8 +7,6	95,3 -45,3(+)	-18,6 141,8
PGK	243,2 =100%	405,2 (+) +66,5	216,9 -10,8	-
ENO	9,2 =100%	16,1 (+) +79,5	7,7 -14,2	11,6 +29,9
PK	58,6 =100%	54,3 -7,3	41,9 -28,4	61,5 +5
GDH	41,6 =100%	35,4 ++ -13,5	31,5 -25,5	37,3 -17,5
LDH	316,1 =100%	362,0 +16,5	340,0 +7,7	305,2 -7,5
MDH	534,0 =100%	572,4 +13,4	405,2 + -25,7	497,5 -15,3
ZF	1,2 =100%	1,6 +33,0	0,9 -25	1,6 +33
ME	2,2 =100%	3,6 +64	1,3 -40,9	3,1 +41
IDH	38,9 =100%	50,8 (+) +36,2	29,0 (+) -26,2	43,5 +9,5
GOT	39,9 =100%	50,1 +25,4	72,0 +80,4	27,7 -30,6
GPT	10,6 =100%	11,1 +25,8	10,7 -2,3	12,3 -5,4
αGPox	4,7 =100%	3,5 -24,7	2,2 -52,4 ++	2,8 -32,7
IDHMi	1,4 =100%	1,7 +14,7	1,2 -18,3	1,4 -0,9
MDH Mi	59,0 =100%	71,9 +22,0	36,3 -38,4	56,0 -5
GLDH	11,3 =100%	9,5 -15,8	12,5 +3,9	8,4 -31,4
	n=64	n=22	n=15	n=5
rel.LG	51,62	77,39 +50	43,15 -19,7	55,93 +8

Tabelle I

	Kontrolle	Phenob.i.p.	Actinom.i.p.	Phenob.i.p. +Actinom.i.p.
	n=4	n=4	n=3	n=2
	IE/LG ₂₅	IE/LG ₂₅	IE/LG ₂₅	IE/LG ₂₅
	Δ%	Δ%	Δ%	Δ%
TPNHox	0,2 =100%	0,8 +++ +182,1	0,2 -22,4	0,3 +17,7
FA	- 9,0 =100%	10,8 +24	9,7 +8	10,6 +18
GAPDH	132,8 =100%	151,8 +23	70,1 (+) -46	105,4 -21
PGK	349,6 =100%	389,8 +9	234,9 (+) -33	333,2 -6
ENO	10,2 =100%	11,5 +13	9,2 -10	10,6 +4
PK	36,6 =100%	52,7 (+) +39	21,3 (+) -43	30,8 -16
GDH	61,7 =100%	58,0 -18	36,7 -40	50,7 -14
LDH	356,4 =100%	356,0 -4	272,0 -25	347,5 -2
MDH	482,3 =100%	494,8 +2	371,7 -23	489,1 +2
ZF	1,0 =100%	1,7 +70	0,9 -10	0,9 -10
ME	3,0 =100%	3,6 +20	1,3 -57	1,4 -55
IDH	28,7 =100%	39,2 +52	22,2 -21	35,0 +33
GOT	16,0 =100%	22,5 +38	22,9 +55	25,3 +93
GPT	6,7 =100%	7,5 +12	8,8 +31	10,7 +59
αGPox	5,4 =100%	4,2 -22	3,0 (+) -46	3,7 -32
IDH Mi	1,4 =100%	1,7 +13	1,0 -29	1,3 -11
MDH Mi	67,5 =100%	107,6 +56	102,7 +49	151,7 +120
GLDH	10,9 =100%	7,4 -30	11,1 +6	10,6 +17
rel.LG	n=64 51,62 =100%	n=14 77,39 +50	n=16 43,15 -20	n=2 55,93 +8

Tabelle II

	Kontrolle	Phenob.s.c.	Actinom.i.p.	Phenob.s.c. +Actinom.i.p.
	n=11	n=11	n=7	n=10
	IE/LG ₂₅	IE/LG ₂₅	IE/LG ₂₅	IE/LG ₂₅
	Δ%	Δ%	Δ%	Δ%
TPNHox	0,2 =100%	0,5+++ +156	0,1+++ -50	0,3 (+) -23
FA	12,2 =100%	14,8 +34	8,1 -18 (+)	12,5 +13
GAPDH	133,0 =100%	163,6 (+) +23	85,1 (+) -35	141,0 +8
PGK	281,6 =100%	376,8 (+) +50	180,2 (+) -25	292,5 +25
ENO	13,8 =100%	16,3 +26,2	8,8 -34,5	13,8 +4,8
PK	37,9 =100%	43,0 +24	25,0 + -21	31,3 + -13
GDH	51,7 =100%	54,8 +8	35,8 + -25	45,8 + -9
LDH	323,0 =100%	385,9 + +19	291,4 -5	365,3 +13
MDH	496,0 =100%	602,8 (+) +20,7	363,8 + -24,2	451,6 -9,4
ZF	0,9 =100%	1,2 +33	1,2 +33	1,1 +22
ME	3,1 =100%	3,0 -3	1,6 -48	1,4 -55
IDH	29,8 =100%	36,9 + +24	19,9 + -30	30,4 +3
GPox	3,3 =100%	3,4 +8	2,3 (+) -16	2,6 + -15
IDH Mi	1,1 = 100%	1,6 ++ +47	1,0 -12	1,3 + +17
MDH Mi	32,8 =100%	46,6 + +51	40,4 +19	46,3 +52
GLDH	8,2 =100%	7,9 -4	11,2 +30	12,2 +++ +48
rel.LG	n=64 51,62 =100%	n=25 64,35 +25	n=16 43,15 -20	n=11 52,87 +12

Tabelle III

	Kontrolle n=25	Phenob. n=25	Actinomycin n=16	Phenob.+Actinom. n=17
	IE/LG 25 Δ%	IE/LG 25 Δ%	IE/LG 25 Δ%	IE/LG 25 Δ%
TPNHox	0,21 =100%	0,56 +++ +156	0,14 +++ -37	0,39 (+) +85
FA	10,51 =100%	12,51 (+) +29	8,37 + -13	12,46 +18
GAPDH	143,32 =100%	176,8 (+) +24	84,61 +++ -41	135,77 + -5
PGK	291,37 =100%	377,43 +++ +36	200,01 +++ -25	299,91 +++ +19
ENO	11,18 =100%	13,95 (+) +32	8,69 (+) +22	12,61 +8
PK	40,34 =100%	40,65 +22	26,90 +++ -28	36,27 + -4
GDH	50,02 =100%	50,82 +0,5	34,52 +++ -28	43,73 (+) -13
LDH	327,34 =100%	365,34 +12	306,07 -4	344,29 +5
MDH	506,56 =100%	590,27 (+) +19	380,78 ++ -25	470,63 + -10
ZF	1,06 =100%	1,42 +34	1,04 -1	1,25 + +18
ME	2,68 =100%	2,89 +7,8	1,34 +++ -50	2,26 + -16
IDH	32,79 =100%	41,89 ++ +32	23,7 ++ -27	35,06 + +9
GOT	22,17 =100%	29,39 +74	42,52 +65	26,51 +31
GPT	9,18 =100%	9,24 (+) +12	10,10 +9	11,87 +13
GPox	4,15 =100%	3,85 -5	2,37 +++ -35	2,80 + -22
IDH Mi	1,26 =100%	1,58 ++ +28	1,05 + -17	1,30 + +11
MDH Mi	44,88 =100%	64,37 (+) +40	55,26 +17	63,29 +58
GLDH	9,65 =100%	8,91 -3	11,57 +17	11,17 (+) +26
rel. LG	n=64 51,62 =100%	n=61 67,67 +31	n=18 43,15 -20	n=18 53,19 +3

Tabelle IV

	Kontrolle n=2	Phenob.p.o. n=2	Actidion i.p. n=0	Phenob.+Actid. n=4
	IE/LG ²⁵ $\Delta\%$	IE/LG ²⁵ $\Delta\%$	IE/LG ²⁵ $\Delta\%$	IE/LG ²⁵ $\Delta\%$
TPNHox	0,24 =100%	0,84 +253	- -	0,6 +148
FA	6,8 =100%	17,6 +161	- -	11,9 +75
GAPDH	156,5 =100%	266,2 +70,1	- -	206,1 +32
PGK	336,5 =100%	649,4 +93	- -	629,7 +87
PK	39,8 =100%	88,8 +123,5	- -	58,8 +48,0
GDH	46,8 =100%	64,6 +38,0	- -	52,5 +12,1
LDH	287,0 =100%	367,1 +28	- -	358,7 +25
MDH	496,2 =100%	769,9 +55	- -	665,4 +34
ZF	1,3 =100%	1,9 +46	- -	1,2 -8
ME	3,3 =100%	4,8 +45	- -	2,1 -26
IDH	41,2 =100%	58,2 +41	- -	60,0 +46
α GPox	2,6 =100%	3,4 +33	- -	3,0 +18
IDH Mi	1,4 =100%	2,1 +50	- -	1,5 +9
MDH Mi	50,7 =100%	65,7 +30	- -	63,3 +23
rel. LG	n=64 51,62 =100%	n=22 77,35 +50	n=11 51,50 +0	n=4 74,21 +44

Tabelle V

	Kontrolle	Phenob.i.p.	Actidion i.p.	Phenob.i.p. +Actidion i.p.
	n=2	n=2	n=2	n=2
	IE/LG ₂₅ Δ % ₂₅	IE/LG ₂₅ Δ % ₂₅	IE/LG ₂₅ Δ % ₂₅	IE/LG ₂₅ Δ % ₂₅
TPNHox	0,14 =100%	0,35 +159	0,16 +11	0,53 +295
FA	10,2 =100%	11,5 +13	8,5 -17	10,1 -1
GAPDH	143,6 =100%	124,2 -14	129,2 -10	170,2 +19
PGK	274,1 =100%	340,4 +24	319,8 +17	437,9 +60
ENO	7,9 =100%	14,4 +82	11,7 +47	13,9 +75
PK	26,7 =100%	21,2 -21	14,8 -45	32,7 +23
GDH	33,3 =100%	28,4 -11	30,7 -1,2	35,1 +6,8
MDH	424,6 =100%	529,9 +22	392,6 -8	530,1 +25
ZF	1,1 =100%	1,1 ±0	1,1 ±0	1,5 +36,3
ME	1,7 =100%	1,1 -35	0,9 -45	1,4 -18
IDH	28,3 =100%	25,6 -20	19,6 -31	28,6 +1
GOT	11,5 =100	18,5 +62	14,3 +25	22,2 +94
GPT	3,3 =100%	6,3 +91	5,9 +79	7,3 +118
IDH Mi.	1,0 =100%	0,9 -11,8	0,8 -21,9	1,0 ±0
MDH Mi	22,9 =100%	32,6 +42	16,4 -28	35,1 +53
GLDH	10,0 =100%	12,2 +22	11,3 +13	11,8 +18
rel.LG	n=64 51,62 =100%	n=14 61,54 +20	n=11 51,50 ±0	n=2 57,35 +12

Tabelle VI

	Kontrolle n=8	Phenob.s.c. n=10	Actidion i.p. n=8	Phenob.s.c. +Actidion i.p. n=4
	IE/LG ₂₅ Δ % ²⁵	IE/LG ₂₅ Δ % ²⁵	IE/LG ₂₅ Δ % ²⁵	IE/LG ₂₅ Δ % ²⁵
TPNHox	0,19 =100%	0,47+++ +147	0,15 -21	0,41 +115
FA	12,0 =100%	14,3 + +21	12,9 +12	14,3 +13
GAPDH	-	- -	-	-
PGK	326,3 =100%	438,9 + +32	399,8 + +21	477,4 +43
PK	45,4 =100%	36,8 -9	25,5 ++ -37	38,9 -15
GDH	61,7 =100%	56,1 -5	57,7 -2	67,4 (+) +10
LDH	436,3 =100%	385,9 -10	424,5 +02	491,4 +15
MDH	718,5 =100%	700,1 +5	555,0 + -14	619,9 -11
ZF	1,3 =100%	1,4 +8	1,2 -8	1,5 +15
ME	3,6 =100%	2,4 -33	2,2 + -39	2,2 + -39
IDH	42,0 =100%	42,1 +9,5	28,1 ++ -25,0	39,5 + -7,6
αGPOx	3,1 =100%	3,0 -4	3,6 (+) +18	4,4 ++ +44
GPT	5,2 =100%	7,1 +34,6	5,1 -2,5	6,6 +25,4
IDH Mi	1,5 =100%	1,6 ++ +30	1,1 -3,5	1,5 (+) +79
MDH Mi	54,2 =100%	53,9++ +24	55,9+ +39,2	76,0 +56,0
GLDH	6,9 =100%	7,3 -2,9	9,0 +19,0	9,3 +27,9
rel. LG	n=64 51,62 =100%	n=25 64,35 +25	n=11 51,50 +0	n=4 61,30 +19

Tabelle VII

	Kontrolle	Phenob.	Actidion	Phenob. + Actidion
	n=14	n=10	n=10	n=10
	IE/LG ²⁵ Δ %	IE/LG ²⁵ Δ %	IE/LG ²⁵ Δ %	IE/LG ²⁵ Δ %
TPNHox	0,19 =100%	0,52 +++ +149	0,21 -16,7	0,46 +150
FA	11,2 =100%	14,4 + +19,8	11,6 +7,2	12,3 +11
GAPDH	124,9 =100%	156,3 +43	77,0 (+) -23	176,1 -10
PGK	315,8 =100%	459,2 ++ +31	379,8 + +20	543,6 + +46
PK	41,3 =100%	41,9 -11,1	23,3 ++ -38,2	45,6 -9
GDH	54,5 =100%	53,4 -6,7	52,3 -5,7	55,0 +9,1
LDH	387,9 =100%	365,5 -4,8	397,9 -0,1	403,1 +17,4
MDH	632,5 =100%	684,4 (+) +15	522,6 + -13	620,1 +14
ZF	1,3 =100%	1,4 +12,8	1,2 -7,2	1,3 +6,4
ME	3,6 =100%	3,3 -34	1,9 -44	2,0 -43
IDH	39,6 =100%	41,6 +10	26,4 ++ -26	45,5 +15
GPT	3,9 =100%	6,8(+) +57	5,4 +30	7,1 +87
αGPox	2,3 =100%	2,3 +2,4	2,6 ++ +18,2	2,9 +31
IDH Mi	1,3 =100%	1,5 ++ +27	1,1 + -4,4	1,4 +6,8
MDH Mi	48,4 =100%	52,5 ++ +27	48,0 +26	62,4 +42
GLDH	7,6 =100%	8,2 +1,2	9,5 +18	10,1 +25
rel. LG	n=64 51,62 =100%	n=61 67,76 +31	n=11 51,50 +0	n=10 65,67 +27

Tabelle VIII

	Kontrolle	Phenob.i.p.	Mitomycin i.p.	Phenob.i.p. +Mitomycin i.p.
	n=2	n=1	n=2	n=2
	IE/LG ₂₅ Δ% ₂₅	IE/LG ₂₅ Δ% ₂₅	IE/LG ₂₅ Δ% ₂₅	IE/LG ₂₅ Δ% ₂₅
TPNHox	0,1 =100%	0,4 +486	- -	0,3 +342
FA	12,1 =100%	14,7 +21	7,0 -43	9,8 -19
GAPDH	81,6 =100%	154,8 +90	90,5 +11	40,1 -51
PGK	469,7 =100%	412,9 -12	422,1 -10	357,1 -24
ENO	13,4 =100%	20,1 +50	8,4 -38	17,4 +30
PK	33,3 =100%	37,2 +12	32,2 -3	25,1 -25
GDH	42,6 =100%	56,8 +33	31,1 -27	37,4 -12
LDH	476,6 =100%	330,3 -31	354,2 -26	309,2 -35
MDH	724,3 =100%	929,0 +28	620,3 -14	637,2 -12
ZF	1,1 =100%	1,4 +27	- -	0,9 -18
ME	1,5 =100%	3,0 +100	- -	1,4 -6,7
IDH	66,6 =100%	173,4 +160	65,7 -1,3	117,5 +76
GOT	19,1 =100%	23,3 +22	21,8 +14	17,9 -6,4
GPT	4,5 =100%	6,7 +48	7,0 +55	8,2 +82
αGPOx	4,8 =100%	4,8 +1	2,7 -44	3,2 -33
IDH Mi	1,6 =100%	1,9 +15	1,0 -39	1,3 -17
MDH Mi	85,0 =100%	69,7 -18	45,5 -46	62,8 -26
GI DH	8,6 =100%	10,1 +17	13,2 +54	8,6 +0
Rel. LG	n=64 51,62 =100%	n=14 61,54 +20	n=5 43,51 -16	n=2 54,71 +9,2

Tabelle IX

	Kontrolle n=3	Phenob. s.c. n=3	Mitomycin i.p. n=3	Phenob. s.c. + Mitomycin i.p. n=2
	IF/LG ²⁵ Δ% ²⁵	IF/LG ²⁵ Δ% ²⁵	IF/LG ²⁵ Δ% ²⁵	IF/LG ²⁵ Δ% ²⁵
TPHox	0,3 =100, %	0,8 (+) +174	0,1 (+) -64	0,7 +117
FA	8,9 =100%	9,5 +6,8	4,8 (+) -44	13,1 +47
GAPDH	56,5 =100%	109,3 (+) +93	34,5 -39	76,5 +35
PGK	512,0 =100%	930,0 (+) +82	362,0 -29	589,4 +15
ENO	11,7 =100%	12,5 +7	4,3 (+) -63	16,5 +41
PK	58,3 =100%	80,5 +38	25,4 (+) -56	48,8 -16
GDH	48,9 =100%	42,2 -14	29,6 (+) -40	36,9 -24
LDH	243,2 =100%	258,7 +6	210,7 -14	248,2 +2
MDH	660,7 =100%	925,3 +40	557,1 -16	778,0 +18
ZF	1,1 =100%	1,6 +45	0,8 -27	1,6 +45
MF	4,7 =100%	4,3 -9	2,1 -55	2,6 -44
IDH	29,2 =100%	43,7 (+) +50	19,6 (+) -33	39,5 +35
GOT	34,4 =100%	52,5 (+) +53	56,1 (+) +63	69,4 +102
GPT	9,3 =100%	20,8 (+) +123	11,4 +22	24,6 +164
αGPox	5,2 =100%	5,4 +4,1	3,6 -31	4,4 -14
IDH Mi	1,2 =100%	1,8 +45	0,9 -29	1,4 +16
MDH Mi	53,6 =110%	75,7 (+) +41	51,0 -4,8	116,5 +117
GLDH	7,9 =100%	10,9 (+) +39	19,0 (+) +142	14,1 +80
rel.LG	n=64 51,62 =100%	n=25 64,35 +25	n=5 43,51 -16	n=3 68,28 +22

Tabelle X

	Kontrolle n=5	Pheno. n=4	Mitomycin n=5	Phenob. + Mitomycin n=4
	IE/LG ₂₅ Δ% ₂₅	IE/LG ₂₅ Δ% ₂₅	IE/LG ₂₅ Δ% ₂₅	IE/LG ₂₅ Δ% ₂₅
TPNHox	0,2 =100%	0,7 (+) +252	0,1 -63,5	0,5 +230
FA	10,2 =100%	10,8 +10	5,7(+) -44	11,4 +14
GAPDH	66,6 =100%	120,7 +92	56,9 -19	58,3 -8
PGK	495,1 =100%	800,7 +58	586,0 -22	475,2 -5
ENO	12,4 =100%	14,4 +18	5,9 +++ -53	16,9 +35
PK	48,3 =100%	69,7 +32	28,1 -35	36,9 -21
GDH	46,4 =100%	45,9 (+) -1,9	30,2 (+) -35	37,2 -19
LDH	336,6 =100%	276,6 -3	267,9 -18	278,8 -17
MDH	692,5 =100%	926,2 +37,1	582,4 -15,2	707,6 +2,9
ZF	1,1 =100%	1,6 +45	0,9 -27	1,2 +9
ME	3,4 =100%	3,9 +15	1,8 -47	2,0 -41
IDH	44,2 =100%	76,1 +77	38,0 -20	78,5 +55
GOT	28,3 =100%	45,2 +45	42,3 +43	43,6 +48
GPT	7,4 =100%	17,3 +105	9,6 +35	16,4 +123
αGPox	5,0 =100%	5,2 + +3,4	3,2 -36	3,8 -24
IDH M1	1,4 =100%	1,8 +38	1,9 -33	1,4 -0,3
MDH M1	66,1 =100%	74,2 +27	48,8 -22	89,7 + +46
GLDH	8,1 =100%	10,7 +34	16,7+ +107	11,4 (+) +40
rel. LG	n=64 51,62 =100%	n=61 67,76 +31	n=5 43,51 -16	n=5 62,85 +22

Tabelle XI

	Kontrolle n=2	Phenob.i.p. n=2	Puromycin i.p. n=2	Phenob.i.p. +Purom. i.p. n=2
	IE/LG $\Delta\%$ 25	IE/LG $\Delta\%$ 25	IE/LG $\Delta\%$ 25	IE/LG $\Delta\%$ 25
TPNHox	0,14 =100%	0,72 +410	0,25 +76	0,69 +387
FA	9,4 =100%	11,0 +16	6,8 -29	14,9 +57
GAPDH	143,8 =100%	156,9 +9	148,1 +3	184,4 +28
PGK	321,4 =100%	387,8 +21	304,8 -5	465,1 +45
ENO /	15,6 =100%	20,8 +34	14,4 -8	23,6 +52
PK	34,9 =100%	44,4 +27	31,7 -10	56,5 +62
GDH	35,8 =100%	39,3 +10	37,0 +3,5	46,5 +30
LDH	334,4 =100%	347,8 +4	322,3 -3,7	326,7 -2,3
MDH	340,2 =100%	479,0 +41	348,4 +2,4	638,9 +88
ZF	3,1 =100%	1,9 -50	2,9 -7	2,4 -21
ME	5,3 =100%	2,6 -51	3,6 -31	4,6 -13
IDH	39,5 = 100%	35,4 -10	41,8 +6	44,9 +14
GOT	20,1 =100%	24,2 +20,5	28,3 +41	32,9 +64
GPT	4,12 =100%	7,15 +74	5,22 +27	9,99 +143
α GPox	5,80 =100%	5,61 -3	6,82 +18	6,97 +20
IDH M1	1,35 =100%	1,45 +8	1,59 +18	1,69 +25
MDH M1	50,1 =100%	54,1 +8	37,7 -25	60,8 +21
GLDH	14,1 =100%	11,1 -21	12,6 -11	16,2 +15
rel. LG	n=64 51,62 =100%	n=14 61,54 +20	n=2 59,13 +9,9	n=2 70,20 +30

Tabelle XII

	Kontrolle n=4	Phenob.i.p. n=4	Paraxin i.p. n=4	Phenob.i.p. +Paraxin i.p. n=4
	IE/LG $\Delta\%$ ²⁵	IE/LG $\Delta\%$ ²⁵	IE/LG $\Delta\%$ ²⁵	IE/LG $\Delta\%$ ²⁵
TPNHox	0,2 =100%	0,6 + +249	0,2 +39	0,3 +135
FA	10,9 =100%	12,4 +14	8,2 -25	14,9 +37
GAPDH	75,0 =100%	139,4 +86	107,7 +44	164,1 +119
ENO	12,8 =100%	14,1 +9,5	4,8 -63	10,4 -19
PK	25,3 =100%	34,7 +37	27,4 +8	36,2 +43
GDH	24,7 =100%	36,3 +47	33,2 +34	38,0 +54
LDH	134,4 =100%	165,0 +23	128,1 -5	174,2 +30
MDH	363,7 =100%	475,1 +31	369,6 +2	324,6 -11
ZF	1,1 =100%	1,5 +25	0,9 -25	0,9 -25
ME	1,6 =100%	1,9 +19	1,4 -13	1,8 +13
IDH	15,8 =100%	18,3 +16	21,0 +33	21,4 +36
GOT	19,7 =100%	21,8 +10	28,5 +45	26,5 +35
GPT	6,0 =100%	6,4 +6	7,6 +27	9,1 +51
α GPox	3,3 =100%	3,0 +8,3	2,7 -3,3	2,7 +4,0
IDH Mi	1,0 =100%	1,4 (+) +42	1,2 +18	1,3 +30
MDH Mi	31,7 =100%	39,1 +34	43,6 +39	48,9 +58
GLDH	11,1 =100%	11,6 +5	22,0 +99	18,0 +62
rel.LG	n=64 51,62 =100%	n=14 61,54 +20	n=10 51,85 +0	n=6 66,29 +31

Tabelle XIII

	Kontrolle	Phenob.s.c.	Paraxin i.p.	Phenob.s.c. +Paraxin i.p.
	n=2	n=2	n=2	n=2
	IE/LG ₂₅ Δ % ²⁵	IE/LG ₂₅ Δ % ²⁵	IE/LG ₂₅ Δ % ²⁵	IE/LG ₂₅ Δ % ²⁵
TPNHox	0,2 =100%	0,9 +490	0,2 +240	0,7 +352
FA	10,0 =100%	15,7 +56	13,5 +34	23,4 -133
PGK	247,0 =100%	530,4 +115	269,2 +9,0	444,2 +80
ENO	9,3 =100%	19,7 +11	9,5 +1,9	23,1 +148
PK	26,8 =100%	43,9 +64	23,6 -12	58,0 +116
GDH	26,4 =100%	38,8 +46,8	31,4 +18,9	28,8 +8,8
LDH	233,4 =100%	291,0 +25	221,3 -5	251,5 +8
MDH	467,9 =100%	956,8 +105	445,7 -5	704,3 +51
ZF	1,0 =100%	1,7 +70	0,7 -30	1,5 +50
ME	2,6 =100%	2,4 -8	1,5 -42	3,7 +42
IDH	21,9 =100%	46,5 +112	28,6 +30	36,2 +65
GPT	6,0 =100%	10,7 +78	7,7 +28	11,1 +86
αGPox	1,6 =100%	1,7 +10	1,3 +48	2,2 +38
IDH M1	0,8 =100%	1,6 +91	1,0 +18	1,2 +51
MDH M1	43,3 =100%	77,7 +79	54,4 +26	95,9 +121
GLDH	10,8 =100%	8,2 -24	9,7 -10	6,4 -41
=====				
rel. LG	n=64 51,62 =100%	n=25 64,35 +25	n=10 51,85 ±0	n=4 81,63 +54,7

Tabelle XIV

	Kontrolle n=6	Phenobarb. n=6	Paraxin n=6	Phenob. + Paraxin n=6
	IE/LG $\Delta\%$ ₂₅	IE/LG $\Delta\%$ ₂₅	IE/LG $\Delta\%$ ₂₅	IE/LG $\Delta\%$ ₂₅
TPNHox	0,16 =100%	0,67++ +329	0,20 +34	0,46 +2,7
FA	10,4 =100%	14,0 + +35	10,83 +5	19,13 +85
GAPDH _{III}	75,1 =100%	139,4 +86	107,7 +44	164,1 +119
PGK	247,0 =100%	530,4 +115	269,2 +9	444,2 +80
ENO	11,1 =100%	13,3 +22	7,1 -31	16,7 +65
PK	28,1 =100%	39,3 + +50	25,5 -2	47,1 +80
GDH	25,6 =100%	37,5+ +47	32,3 +27	33,4 +31
LDH	183,9 =100%	228,0 + +24	174,7 -5	212,8 +19
MDH	415,8 =100%	715,9 + +68	407,7 _{III} -2	514,4 +20
ZF	1,0 =100%	1,5 +43	0,8 -23	1,1 +9
ME	2,1 =100%	2,1 +1	1,5 -30	2,7 +32
IDH	18,9 =100%	32,4 + +64	24,8 +32	28,8 +50
GOT	19,7 =100%	21,8 +10,4	28,6 +45	26,6 +35
GPT	6,0 =100%	8,5 +42	7,7 + +27	10,1 +68
α GPox	2,72 =100%	2,55 +8,8	2,55 +13,7	2,54 +15,5
IDH M1	1,02 =100%	1,36 +42	1,12 +13	1,23 +25
MDH M1	42,3 =100%	52,6 +36	47,2 +12	64,6 +74
GLDH	10,9 =100%	9,9 -10	15,8 +44	12,2 +11
=====				
rel. LG	n=64 51,62 =100%	n=61 67,76 +31	n=10 51,85 ± 0	n=10 72,43 +40

G. Literaturverzeichnis

1. Arias, J.M., Doyle, D., Schimke, R.:
J. Biol. Chem. 244, 3303 (1969)
2. Beisenherz, G., Boltze, H.J., Bücher, Th.,
Czock, R., Garbach, K.H., Mayer-Arendt, E.,
Pfleiderer, G.:
Zeitschrift f. Naturf. 8b, Heft 10, 555 (1953)
3. Bennett, L.L., Smithers, D. and Ward, C.T.:
Biochim. Biophys. Acta 87, 60 (1964)
4. Bowne, S.W. and Rogers, P.:
Biochim. Biophys. Acta 76, 600 (1963)
5. Brodie, B.B. et al.:
Ciba Foundation Symposium, Enzymes and Drug
Action 317 (1962)
6. Bücher, Th., Klingenberg, M.:
Angew. Chem. 70, 552 (1958)
7. Conney, A.H. and Gilman, A.G.:
J. Biol. Chem. 238, 3682 (1963)
8. Conney, A.H., Davison, C., Gastal, R. and
Bürns, J.J.:
J. Pharmacol. exp. Ther. 130, 1 (1960)
9. Dellweg, H.:
Molekular-Biologie, Umschau Verlag Frankfurt,
S. 103 (1967)
10. Gelboin, H.V. and Blackburn, N.:
Biochim. et Biophys. Acta 72, 657 (1963)
11. Goldberg, J.H. and Reich, E.:
Federation Proc. 23, 959 (1964)
12. Hamilton, L.D., Fuller, W. and Reich, E.:
Nature 198, 538 (1963)
13. Herbold, R.:
Diss. Marburg 1969
14. Hilf, R., Goldenberg, H. and Bell, C.:
Proc. Am. Assoc. Cancer Res. 27, 1485 (1967)

15. Iyer, V.N. and Szybalsky, W.:
Proc. Nat. Acad. Sci. 50, 355 (1963)
16. Jacob, F. and Monod, J.:
J. Mol. Biol. 3, 318 (1961)
17. Yarmonlinsky, M.B. and de la Habra, G.L.:
Proc. Nat. Acad. Sci. 45, 1729 (1959)
18. Young, C.W., Hodas, S. and Fenelly, J.:
Proc. Am. Assoc. Cancer Res. 5, 279 (1964)
19. Kerridge, D.:
J. Gen. Microbiol. 19, 947 (1958)
20. Kreyszig, E.:
Statistische Methoden und ihre Anwendung
Vandenhoeck und Ruprecht, Göttingen (1965)
21. Kunz, W.:
Habilitationsschrift, Marburg 1963
22. Kunz, W., Schaudé, G., Siess, M., Schmid, W.:
Volume VII of Proceedings of the European
Society for the study of drug toxicity
Meeting in Rowe, Italy, 1966
23. Kunz, W., Schaudé, G., Siess, M., Schmid, W.:
Naun. Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmac.
254, 470 (1966)
24. Kunz, W., Schaudé, G., Siess, M., Schmid, W.:
Cancer Meeting July 1967, Wien
25. Mische, H.:
Diss. Marburg 1967
26. Nathaus, D., von Ehrenstein, G., Munro, R. and
Lipman, F.:
Federation Proc. 21, 127 (1962)
27. Omura, T. and Sato, R.:
J. Biol. Chem. 239, 2370 (1964)
J. Biol. Chem. 239, 2379 (1964)
28. Pharmakologisch-toxikologisches Praktikum,
25.3. - 25.4.1968
Pharmakologisches Institut, Tübingen
29. Reel, R.J. and Kenney, F.T.:
Bioch. Biophys. Acta 53, 132 (1961)
30. Reich, E., Shatkin, A.J. and Tatum, E.L.:
Biochem. Biophys. Acta 53, 132 (1961)

31. Remmer, H. und Merker, J.H.:
Klin. Wochenschr. 41, 276 (1963)
32. Richter, E., Grün, M., Kühn, H.A.:
Verb. dtsh. Ges. Inn. Med. 75, 369 (1969)
33. Rosen, F., Raina, P.N., Milholland, R.J.
and Nichol, C.A.:
Science 146, 661 (1964)
34. Schlicht, J., Koransky, W., Mayour, S. und
Schulte-Hermann, R.:
Naun.-Schniedeberg's Arch. Pharmak.u. exp.
Path. 261, 26 (1968)
35. Schulte-Hermann, R., Thom, R., Schlicht, I.
und Koransky, W.:
Naun.-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak.
u. exp. Path. 261, 42 (1968)
36. Shuster, L. and Jick, H.:
J. Biol. Chem. 241, 5361 (1966)
37. Staehlin, Wettstein and Noll:
Science 140, 180 (1963)
38. Sypherd, P.S. and Strauss, N.:
Proc. Nat. Acad. Sci. 49, 400 (1963)
39. Tomkins, G.M., Gelehrter, T.D., Granner, D.,
Martin, D., Samuels, H.H., Thomson, E.B.:
Science 166, 1477 (1969)
40. Waksman, S. and Woodruff, H.B.:
Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 45, 609 (1940)

Meinem Lehrer, Herrn Professor Dr. med. W. Kunz,
danke ich herzlich für die Überlassung des Themas,
für seine freundliche Hilfe bei der Durchführung
der Versuche und bei der Anfertigung dieser Arbeit.

Mein Dank gilt auch Herrn Professor Dr. med. W. Schmid
für die großzügigen Arbeitsmöglichkeiten am Pharmako-
logischen Institut.

L e b e n s l a u f

Am 29. 4. 1938 wurde ich als Tochter des Bundesbahnobersekretärs Robert Kuntzsch und seiner Ehefrau Luise geb. Kaiser in Kassel geboren.

Von 1945 bis 1949 besuchte ich die Volksschule in Gombeth (Kreis Fritzlar-Homberg, Bez. Kassel) und trat Ostern 1949 in das Realgymnasium August-Vilmar-Schule in Homberg/Efze ein. Ab 1952 besuchte ich die Heinrich-Schütz-Schule in Kassel und legte dort 1958 die Reifeprüfung ab.

Im Sommersemester 1958 schrieb ich mich in die Philosophische Fakultät der Philipps-Universität Marburg ein und wechselte im Wintersemester 1958/59 in die Medizinische Fakultät über. Am 27. 10. 1959 bestand ich die naturwissenschaftliche Vorprüfung und am 26. 4. 1961 die ärztliche Vorprüfung in Marburg. Im Wintersemester 1961/62 und im Sommersemester 1962 war ich an der Universität in Wien eingeschrieben. Anschließend kehrte ich nach Marburg zurück, wo ich am 8. 10. 1964 die ärztliche Prüfung ablegte. Meine Medizinalassistentenzeit von November 1964 bis Juli 1965 und von Juni 1966 bis Dezember 1967 leistete ich an der Dermatologischen Universitätsklinik in Marburg, am Stadt- und Kreiskrankenhaus Minden/Westf., am Stadtkrankenhaus Kassel und in der Medizinischen Universitätsklinik Marburg ab. Am 31. 12. 1967 erhielt ich die Bestallung als Ärztin. 1968 war ich am Pharmakologischen Institut der Universität Marburg angestellt und arbeitete unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. W. Kunz an den Experimenten zu der vorliegenden Arbeit. Zur Weiterbildung als Fachärztin für Anästhesie war ich an folgenden Krankenanstalten tätig: Vom 1. 1. 1969 bis zum 31. 12. 1970 in der Zentralen Anästhesieabteilung am Stadtkrankenhaus Kassel, vom 1. 1. 1971 bis zum 31. 12. 1971 in der Chirurgischen Universitäts-Poliklinik Freiburg/Brsg. und vom 1. 2. 1972 bis zum 5. 2. 1973 in der Anästhesie-Abteilung des Freiburger Diakonie-Krankenhauses. Am 23. 7. 1973 erhielt ich von der Ärztekammer Südbaden die Anerkennung zur Fachärztin für Anästhesie. Seit dem 1. 11. 1973 arbeite ich in der Anästhesie-Abteilung des Städtischen Krankenhauses in Fulda. Seit 1965 bin ich mit dem Facharzt für Mund- und Kieferchirurgie, Dr. med. Horst Reichwein, verheiratet; wir haben zwei Kinder.

Meine akademischen Lehrer waren die Herren Professoren und Dozenten

in Marburg:

Beckmann, Beermann, Bock, Braun-Falco, Bücher, Dimroth, Eggstein, Exner, Förster, Gedigk, Gross, Hamm, Hartmann, Hensel, Hildebrandt, Hornung, Huber, Jacob, Kellner, Kessel, Lang, Linneweh, Löhr, Mahr, v. Manger-König, Martini, Mattes, Maurath, du Mesnil de Rochemont, Müller, Niessing, Nieth, Oehmig, Oksche, Petry, Pirson, Rodeck, Rollhäuser, Schmid, Schmitz, Schölmerich, Schwaiger, Seidel, Siegert, Siess, Stender, Straub, Streicher, Vogt, Wahl, Walcher, Waller, Wendt, Würterle;

in Wien:

Antoine, Böck, Brücke, Fellingner, Fuchsig, Hoff, Kucsko, Langer, Moritsch, Novotny, Obiditsch-Mayer, Reimer, Swoboda.



